

Chương 46. *Mycobacterium tuberculosis*

Mục lục

Chương 46. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
46.1. Giới thiệu	3
46.2. Phân loại	3
46.3. Đặc điểm chung	4
46.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
46.5. Đặc điểm của vi khuẩn <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
46.5.1. Hình thái	6
46.5.2. Nuôi cấy	7
46.5.3. Phản ứng sinh hoá	9
46.6. Các đặc điểm khác của mycobacteria.....	10
46.7. Thành phần thành tế bào và cấu trúc kháng nguyên	10
46.7.1. Thành tế bào	10
46.7.2. Cấu trúc kháng nguyên.....	11
46.8. Phát sinh bệnh và miễn dịch	11
46.8.1. Yếu tố gây độc.....	11
46.8.2. Phát sinh bệnh lao	13
46.9. Miễn dịch của cơ thể chủ	15
46.10. Hội chứng lâm sàng.....	16
46.10.1. Biến chứng của bệnh lao.....	18
46.10.2. Bệnh lao và HIV	18
46.11. Dịch tễ học	18
46.11.1. Phân bố về địa lý.....	18
46.11.2. Môi trường sống	19
46.11.3. Nguồn ẩn náu, nguồn lây nhiễm và sự lan truyền	19
46.12. Phát hiện tại phòng thí nghiệm	20
46.12.1. Mẫu thử	21

46.12.2.	Soi dưới kính hiển vi.....	22
46.12.3.	Nuôi cấy	25
46.12.4.	Xác định vi khuẩn	25
46.12.5.	Mycobacteria nhạy cảm với kháng sinh	29
46.12.6.	Chẩn đoán bằng huyết thanh.....	29
46.12.7.	Cấy vào động vật	29
46.12.8.	Thử nghiệm tuberculin trên da.....	30
46.12.9.	Phương pháp nhanh và tự động	31
46.12.10.	Phương pháp phân tử	32
46.13.	Điều trị	33
46.13.1.	Thuốc trị lao dòng thứ nhất.....	33
46.13.2.	Thuốc kháng lao thể hệ thứ hai.....	34
46.14.	Ngăn ngừa và kiểm soát	35
46.14.1.	Phòng ngừa bằng hóa học	35
46.14.2.	Tiêm vaccin.....	35
46.14.3.	Biện pháp sức khỏe tổng thể.....	36

46.1. Giới thiệu

Giống *Mycobacterium* thuộc họ Mycobacteriaceae gồm các trực khuẩn không di động, không hình thành bào tử. Chúng là những vi khuẩn có hình que hơi cong, đôi khi biểu hiện dạng sợi và phân nhánh. Trong môi trường lỏng, khuẩn này hình thành màng mỏng trông giống như nấm sợi. Vì vậy tên *Mycobacterium* có nguồn gốc từ chữ nấm sợi (mould) nghĩa là khuẩn trông giống nấm.

Thành tế bào của *Mycobacterium* dày, phức tạp và giàu lipid, bề mặt là lớp cấu tạo kỵ nước. Thành tế bào giàu lipid cũng làm cho vi khuẩn kháng được các chất khử trùng sử dụng phổ biến và các chất nhuộm ở phòng thí nghiệm. Do thành tế bào giàu lipid nên rất khó nhuộm mycobacteria. Tuy nhiên một khi đã nhuộm được, thì khuẩn này kháng được sự làm mất màu do dung dịch acid và alcohol. Vì vậy chúng được gọi là trực khuẩn kháng acid (AFB). Mặc dù *Mycobacterium* là vi khuẩn Gram dương nhưng chúng rất khó nhuộm và ăn thuốc nhuộm rất kém khi nhuộm Gram. Hầu hết mycobacteria tăng trưởng chậm, thời gian thế hệ từ 2 - 24 giờ. Khuẩn này đòi hỏi thời gian ủ là từ 3 - 8 tuần để hình thành khuẩn lạc nhận thấy được trên môi trường rắn.

46.2. Phân loại

Giống *Mycobacterium* có hơn 70 loài, trong đó có nhiều loài gây bệnh cho người. Các loài *Mycobacterium* gây bệnh ở người phổ biến nhất được tóm tắt ở Bảng 46.1. Năm 1882, Robert Koch (1843 – 1910) đã phân lập trực khuẩn gây u lao ở động vật có vú và đã thiết lập được vai trò gây ra bệnh lao của khuẩn này, do thỏa mãn tất cả các tiêu chí mà Koch đưa ra. Đến năm 1874, Hansen đã xác định *Mycobacterium leprae* là loài đầu tiên thuộc giống *Mycobacterium*. Sau đó *Mycobacterium tuberculosis* được chứng minh là vi khuẩn gây bệnh lao. Phức hợp *Mycobacterium tuberculosis* là thuật ngữ được sử dụng hiện nay gồm bốn loài có thể gây bệnh lao ở người và động vật có vú, đó là:

- (1). *M. tuberculosis*, type gây bệnh cho người;
- (2). *Mycobacterium bovis*, type gây bệnh cho bò;
- (3). *Mycobacterium africanum*, loài trung gian giữa type ở người và bò và gây bệnh lao ở người phổ biến ở Châu Phi nhiệt đới; và
- (4). *Mycobacterium microti*, loài gây bệnh cho dê và các động vật nhỏ khác nhưng

không gây bệnh cho người.

Bảng 46.1. Bệnh ở người do các loài *Mycobacterium* phổ biến nhất gây ra.

Vi khuẩn	Bệnh
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Lao
<i>Mycobacterium leprae</i>	Phong
Phức hợp <i>Mycobacterium avium</i>	Bệnh cơ hội do mycobacteria (bệnh phổi, bệnh hạch bạch huyết, bệnh phân tán rải rác (disseminated disease))
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Bệnh cơ hội do mycobacteria (bệnh phổi)
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Bệnh cơ hội do mycobacteria (áp se sau chấn thương)
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Bệnh cơ hội do mycobacteria (áp se sau chấn thương)
<i>Mycobacterium abscessus</i>	Bệnh cơ hội do mycobacteria (nhiễm trùng da)

Mycobacteria sống hoại sinh là nhóm thứ ba của các loài mycobacteria được phân lập từ các nguồn khác nhau. Loài này được phân lập từ các động vật máu lạnh và máu nóng, từ các vết loét da và từ môi trường như đất và nước.

Ban đầu nhóm mycobacteria hoại sinh được gọi là mycobacteria không điển hình từ môi trường hay mycobacteria gây bệnh cơ hội nhưng hiện nay các loài này được ấn định là mycobacteria hơn là nhóm mycobacteria gây bệnh u lao điển hình (MOTT).

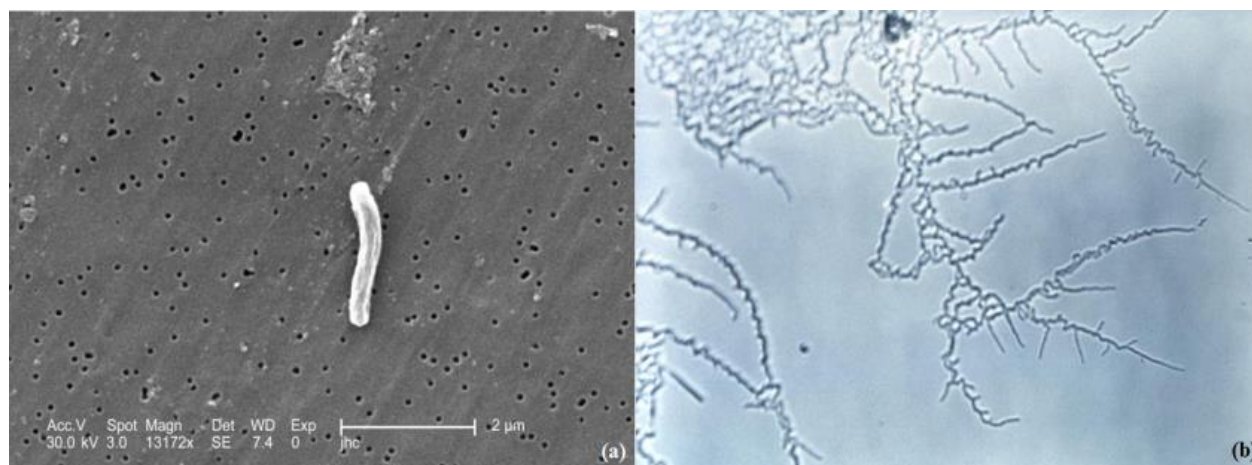
46.3. Đặc điểm chung

Các thành viên thuộc giống *Mycobacterium* biểu hiện các đặc điểm sau:

- (1). Chúng có khả năng kháng được acid (acid fast).
- (2). *Mycobacterium* có mycolic acid, gồm 60 - 90 carbon, được chẻ ra để tạo ra các ester methyl acid béo.
- (3). Khuẩn này có hàm lượng guanine và cytosine cao chiếm từ 61 - 71% DNA.

Thành tế bào *Mycobacterium* thì phức tạp, tương tự như thành vi khuẩn Gram dương. Thành có màng tế bào chất rất đặc đáo, bao xung quanh là lớp peptidoglycan dày và lớp mycolic acid có tính kháng nguyên cao. Thành tế bào dày và giàu lipid. Tính phức tạp của thành tế bào nói lên nhiều đặc điểm của vi khuẩn. Mycolic acid gồm peptidoglycolipid, glycolipid và lipid. Các thành phần này chiếm gần 60% trọng lượng chất khô của tế bào. Lớp ngoài gồm các chuỗi peptide và là một kháng nguyên quan

trọng của vi khuẩn, cảm ứng sự miễn dịch tế bào ở những bệnh nhân bị nhiễm.



Hình 46.1. (a). Ảnh *M. tuberculosis* dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM), nguồn CDC. *M. tuberculosis* là vi khuẩn hiếu khí bắt buộc, chỉ có thể tồn tại trong môi trường có oxygen. Khuẩn này dài từ 2 - 4 μm, rộng từ 0,2 - 0,5 μm. *M. tuberculosis* thường tấn công vào phổi, nhưng vi khuẩn lao có thể tấn công bất kỳ phần nào của cơ thể như thận, xương sống và não. Nếu không được điều trị thích hợp, bệnh lao có thể gây chết. Lao là một trong những bệnh gây chết hàng đầu trên thế giới. Bệnh lây lan từ người sang người qua đường không khí. Vi khuẩn này đi vào không khí khi người bị bệnh lao phổi ho hoặc hắt xì hơi. Những người lân cận có thể hít vi khuẩn này vào và trở nên bị nhiễm khuẩn. Tuy nhiên không phải bất cứ người nào nhiễm khuẩn lao đều trở nên bệnh. Người không biểu hiện bệnh được gọi là nhiễm khuẩn lao tiềm tàng. Người nhiễm khuẩn lao tiềm tàng không cảm thấy bị bệnh vì không có bất kỳ triệu chứng gì và cũng không gây bệnh lao cho người khác. Tuy nhiên một số người bị nhiễm khuẩn lao tiềm tàng sẽ trở nên bị bệnh lao. Người bị bệnh lao khởi phát nên được điều trị. Thậm chí tốt hơn nữa người bị nhiễm khuẩn lao tiềm tàng có thể uống thuốc để vi khuẩn không phát triển thành bệnh lao khởi phát. (b). *Mycobacterium fortuitum* dưới kính hiển vi (400X) hình dạng trông giống nấm sợi, nguồn CDC.

Dẫn xuất protein tinh sạch (PPD) của lớp ngoài này được sử dụng làm nguồn kháng nguyên trong thử nghiệm ở da để chứng minh phản ứng quá mẫn cảm của cơ thể chủ đối với *M. tuberculosis*

46.4. *Mycobacterium tuberculosis*

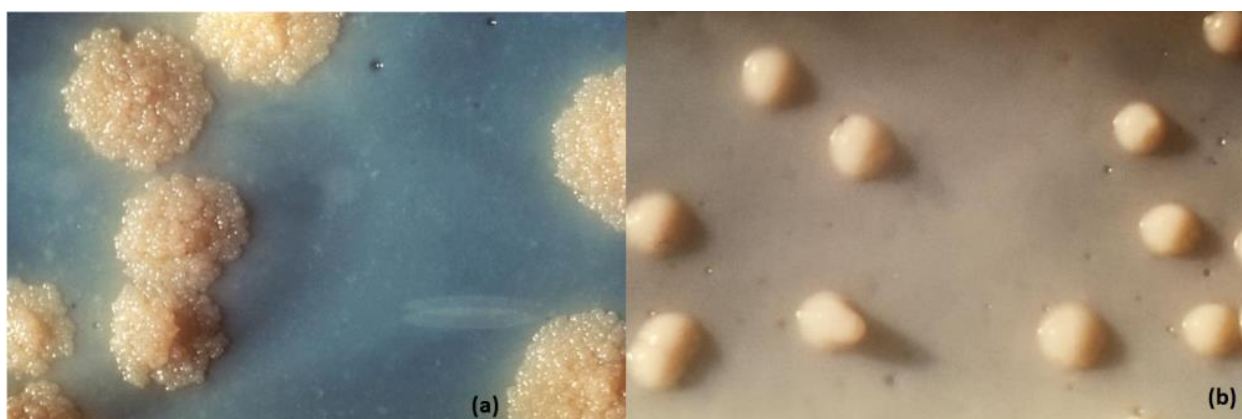
M. tuberculosis là khuẩn gây bệnh lao, lao là một trong những bệnh truyền nhiễm gây chết người hàng đầu trên thế giới. Bệnh lao phổ biến nhất ở Đông Nam Á, Khu vực cận Saharan của Châu Phi và Tây Âu. Theo Tổ chức Sức khỏe thế giới (WHO) mỗi năm có hơn 8 triệu trường hợp mới mắc phải bệnh lao.

46.5. Đặc điểm của vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis*

46.5.1. Hình thái

M. tuberculosis biểu hiện các đặc điểm hình thái sau:

(1). Tế bào vi khuẩn *M. tuberculosis* có dạng hình que thẳng hay cong nhẹ, xuất hiện ở dạng tế bào đơn, cặp đôi hoặc từng đám nhỏ.



Hình 46.2. Khuẩn lạc *Mycobacterium* trên môi trường rắn Lowenstein – Jensen, hình thành khuẩn lạc khô, nhô lên và không đều, bề mặt có lớp nhẵn. (a). Khuẩn lạc *M. tuberculosis* hình thành trên môi trường rắn không màu, bề mặt ráp. (b). Khuẩn lạc *Mycobacterium avium*, khuẩn này thuộc nhóm hoại sinh thường phát hiện trong nước và đất. *Mycobacterium avium* thường kết hợp với *Mycobacterium intracellulare*, hình thành nên phức hợp *Mycobacterium avium* còn gọi là MAC. MAC gây ra một số hội chứng khác nhau gồm nhiễm trùng lan toả (disseminated infection), thường có liên quan đến bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch do HIV và ít phổ biến hơn là bệnh phổi ở bệnh nhân không bị suy giảm miễn dịch. Ở trẻ hội chứng phổ biến nhất là viêm hạch bạch huyết cổ (CDC).

(2). Khuẩn này có kích thước khoảng $3 \times 0,3 \mu\text{m}$ (Hình 46.1a); đôi khi xuất hiện ở

dạng sợi (Hình 46.1b). *M. bovis* thường ngắn hơn *M. tuberculosis*.

(3). *M. tuberculosis* là vi khuẩn Gram dương nhưng nhuộm khó, khuẩn này ăn chất nhuộm kém khi nhuộm Gram.

(4). Chúng là những vi khuẩn không di động, không hình thành bào tử và không có capsule.

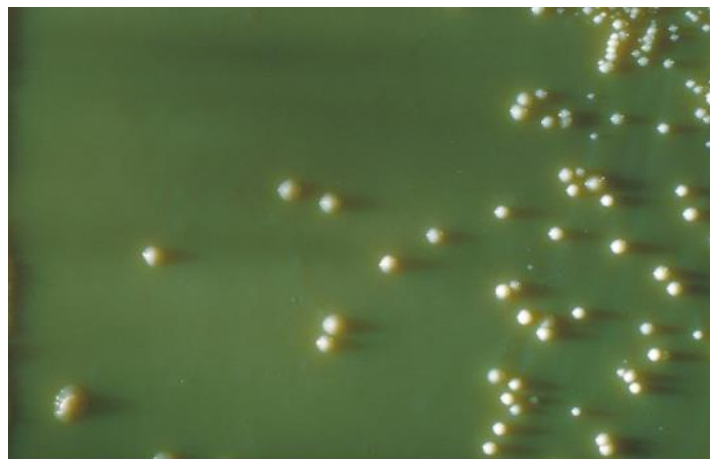
Tính bền vững acid của vi khuẩn: *M. tuberculosis* bền vững với acid và alcohol; khuẩn này kháng lại sự làm mất màu do sulfuric acid 20% và còn tuyệt đối. Nhuộm acid-fast là đặc điểm quan trọng của vi khuẩn và được sử dụng rộng rãi để xác định vi khuẩn. Quy trình nhuộm Ziehl - Neelsen (ZN) được sử dụng để chứng minh tính bền vững màu trước acid của vi khuẩn (Hình 46.4). Với kỹ thuật nhuộm này, *M. tuberculosis* có màu đỏ sáng, trong khi mô tế bào và các vi sinh vật khác có màu xanh da trời. Trục khuẩn lao cũng có thể được nhuộm bằng chất vàng O (Auramine O) và kiểm tra dưới kính hiển vi phát huỳnh quang. Khi đó khuẩn này xuất hiện ở dạng hình que phát huỳnh quang màu sáng ngược với nền màu tối. Các hạt Much là dạng không bền với acid (nonacid-fast) của trục khuẩn lao được chứng minh có trong mủ áp se lạnh, khi chúng được tiêm vào các động vật nhạy cảm có thể gây ra bệnh.

46.5.2. Nuôi cấy

M. tuberculosis là vi khuẩn hiếu khí bắt buộc và có đặc điểm tăng trưởng rất chậm trên môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ tối thích là 37°C và khuẩn này không tăng trưởng dưới 25°C hay trên 40°C. pH tối thích từ 6,4 - 7,0. *M. bovis* là vi khuẩn vi hiếu khí khi tăng trưởng trên môi trường phân lập ban đầu và sau đó sẽ trở nên hiếu khí khi phân lập thuần. *M. tuberculosis* là trục khuẩn tăng trưởng rất chậm, có thời gian thế hệ từ 14 - 15 giờ. Vì vậy cần ủ kéo dài để chứng minh sự tăng trưởng của vi khuẩn. Khuẩn lạc thường xuất hiện trong 2 tuần nhưng đôi khi đòi hỏi phải ủ kéo dài trên 8 tuần để thấy rõ được khuẩn lạc. *M. tuberculosis* có thể tăng trưởng trên môi trường rắn và môi trường lỏng giàu dinh dưỡng.

(1). Nuôi cấy trên môi trường rắn: các môi trường rắn thường sử dụng là (i) môi trường có chứa trứng gồm môi trường Lowenstein - Jensen (LJ), môi trường Petraghani và Dorset có trứng; (ii) môi trường có máu (môi trường Tarshis), môi trường kết hợp với

huyết thanh (thạch nghiêng Loeffler có huyết thanh), hay (iii) môi trường cơ bản có khoai tây (môi trường Pawlowsky). Trên những môi trường này, *M. tuberculosis* hình thành khuẩn lạc khô, nhô lên và không đều, bề mặt có lớp nhẵn (Hình 46.2 và 46.3).



Hình 46.3. Hình dạng khuẩn lạc của 15 chủng *Mycobacteria* spp. trên môi trường Lowenstein - Jensen. Giống *Mycobacterium* gồm hơn 70 loài bao gồm cả các loài *M. tuberculosis* và *M. leprae*, là vi khuẩn gây bệnh lao và bệnh phong (CDC).

(a). Môi trường LJ: môi trường LJ không có tinh bột được khuyến cáo sử dụng rộng rãi. LJ gồm cả nguyên trứng đông, asparagine, malachite green, muối khoáng và glycerol hay sodium pyruvate. Malachite green ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn khác ngoài mycobacterium. Thêm vào 0,75% glycerol làm tăng cường sự tăng trưởng của *M. tuberculosis*, nhưng ức chế sự tăng trưởng của *M. bovis*. Trên môi trường LJ sau 6 - 8 tuần ủ, *M. tuberculosis* hình thành khuẩn lạc có màu vàng nhạt hay màu da bò (Hình 46.3).

(2). Nuôi cấy trên môi trường lỏng: môi trường lỏng thường sử dụng gồm dung dịch Soloac, môi trường Dubos và môi trường Middlebrook's và Beck's. Trong môi trường lỏng, *M. tuberculosis* trước tiên phát triển ở đáy và sau đó bám chặt vào bề mặt bên và tạo thành màng mỏng trên bề mặt có thể mở rộng dọc theo các bên trên bề mặt môi trường. Trong môi trường Dubos có Tween 80, vi khuẩn tạo ra sự tăng trưởng khuếch tán. Trong môi trường có glycerol, chúng hình thành lớp màng màu trắng trắng có nếp nhăn và có hạt lắng đọng ở đáy. Các chủng gây bệnh thường hình thành sợi dây dài uốn lượn trong môi trường lỏng. Ngược lại các chủng không gây bệnh tạo ra sự tăng trưởng tương đối phân tán trong môi trường lỏng. Môi trường lỏng không được sử dụng để nuôi cấy thường quy trong phòng thí nghiệm. Chúng thường được sử dụng cho mục đích (i) tăng sinh mycobacteria để lấy kháng nguyên và chế tạo vaccine và (ii) đánh giá

tính nhạy cảm kháng sinh của *M. tuberculosis*.

46.5.3. Phản ứng sinh hoá

M. tuberculosis biểu hiện các đặc tính sinh hoá sau:

(1). Thử nghiệm niacin là thử nghiệm quan trọng để xác định các chủng *M. tuberculosis* ở người có niacin dương và phân biệt chúng với các chủng *M. bovis* có niacin âm. Các chủng *M. tuberculosis* ở người có niacin dương. *M. simiae* và một số chủng của *M. chelonae* cũng có niacin dương. Các vi khuẩn này làm cho niacin như là sản phẩm phụ qua biến dưỡng khi chúng tăng trưởng trên môi trường rắn có trứng.

Bảng 46.2. Đặc điểm khác biệt giữa các chủng *M. tuberculosis*.

Đặc điểm	Chủng <i>M. tuberculosis</i> ở:			
	Người	Bò	Châu Á	Châu Phi
Nhu cầu oxygen	Hiếu khí	Vi hiếu khí	Hiếu khí	Vi hiếu khí
Tăng trưởng trong thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) (5 mg/L)	+	-	-	-
Niacin	+	-	+	Dao động
Khử nitrate	+	-	+	Dao động
Kiểu phage	A, B, C	A	I	A

(2). *M. tuberculosis* thường có catalase dương. Hoạt tính catalase của *M. tuberculosis* mất đi khi khuẩn này trở nên kháng isoniazid (INH). Các chủng *M. tuberculosis* có catalase âm thường không gây bệnh cho chuột lang.

(3). *M. tuberculosis* có amidase dương, khuẩn này sản sinh ra enzyme amidase như nicotinamidase và pyrazinamidase, giúp phân cắt nhiều cơ chất amide.

(4). *M. tuberculosis* có khả năng khử nitrate do có enzyme nitrate reductase khử nitrate thành nitrite. *M. bovis* và *M. avium* không có enzyme nitrate reductase và vì vậy có phản ứng khử nitrate âm.

(5). *M. tuberculosis* cũng như *M. bovis* cho kết quả dương khi thử nghiệm với chỉ thị đỏ trung tính (neutral red). Khuẩn này có đặc tính liên kết với chỉ thị đỏ trung tính trong dung dịch đệm alkaline.

(6). *M. tuberculosis* có thử nghiệm arylsulfate âm.

Đặc điểm khác biệt giữa các chủng *M. tuberculosis* được tóm tắt ở Bảng 46.2.

46.6. Các đặc điểm khác của mycobacteria

Mycobacteria bị tiêu diệt ở nhiệt độ 60°C trong 15 - 20 phút. Tuy nhiên sự tiêu diệt vi khuẩn phụ thuộc vào đặc tính tự nhiên của mẫu bệnh phẩm mà vi khuẩn hiện diện. *Mycobacteria* trong mẫu đờm có thể sống sót trong 20 - 30 giờ, nhưng trong mẫu đờm khô không ánh sáng chúng có thể tồn tại lâu hơn trên 6 tháng. Trong giọt nhân, chúng có thể tồn tại từ 8 - 10 ngày. Khuẩn này bị tiêu diệt khi phơi nhiễm trực tiếp dưới ánh sáng mặt trời trong 2 giờ, nhưng có khả năng tồn tại ở nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian 6 - 8 tháng.

Trực khuẩn lao nhạy cảm với formaldehyde và glutaraldehyde. Chúng bị cồn iodine tiêu diệt trong 5 phút và bị ethanol 80% tiêu diệt trong 2 - 10 phút. Khuẩn này thường kháng với các chất khử trùng hơn so với các trực khuẩn không sinh bào tử khác. Chúng có thể sống sót khi phơi nhiễm với phenol 5%, sulfuric acid 15%, nitric acid 3%, oxalic acid 5%, và sodium hydroxide 4%.

M. tuberculosis nhạy cảm với pyrazinamide, trong khi đó *M. bovis* và các mycobacteria khác lại kháng được. *M. tuberculosis* kháng thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH), ngược lại *M. bovis* thì nhạy cảm.

46.7. Thành phần thành tế bào và cấu trúc kháng nguyên

46.7.1. Thành tế bào

Thành tế bào của *M. tuberculosis* gồm bốn lớp: (1) lớp peptidoglycan, (2) lớp arabinogalactan, (3) lớp mycolic acid và (4) lớp mycoside. Peptidoglycan là lớp trong cùng liên kết cộng hoá trị với arabinogalactan (polysaccharide) và các đầu cuối của nó liên kết với mycolic acid. Lớp peptidoglycan này nằm chồng lấn với polypeptide và lớp mycolic acid gồm các lipid tự do và peptidoglycolipid. Các lipid này cấu thành nên gần 60% trọng lượng chất khô của thành tế bào.

Các chuỗi peptide hiện diện ở lớp ngoài là các kháng nguyên quan trọng, chất này kích thích sự miễn dịch qua trung gian tế bào (CMI) trong cơ thể bị nhiễm. Dẫn xuất protein tinh sạch (Purified Protein Derivative – PPD) được chiết tách và làm tinh sạch,

được sử dụng làm kháng nguyên trong thử nghiệm bệnh lao ở da. Mycolic acid thuộc lipid của thành tế bào đóng vai trò đảm nhận nhiều đặc tính đặc trưng của vi khuẩn. Các đặc điểm này gồm (i) bền vững với acid, (ii) tăng trưởng chậm do làm chậm tiến trình thẩm của chất dinh dưỡng, (iii) kháng lại nhiều kháng sinh thường được sử dụng, (iv) kháng được các chất tẩy, (v) hiếm khi kháng được acid và chất kiềm và (vi) hình thành đông tụ hay thành sợi.

46.7.2. Cấu trúc kháng nguyên

Các chủng *M. tuberculosis* thì đồng dạng về kháng nguyên. *M. tuberculosis* có kháng nguyên tương tự như kháng nguyên của *M. bovis* và *M. microti* nhưng khác biệt với các loài khác. Mycobacteria có hai kiểu kháng nguyên: (a) kháng nguyên dạng polysaccharide không tan có trong thành tế bào (b) kháng nguyên dạng protein tan được thuộc tế bào chất. Tính đặc hiệu của nhóm là do polysaccharide hiện diện trong thành tế bào. Polysaccharide này bao gồm cả arabinogalactan, lipoarabinomannan và cũng có cả lipid, glycolipid và peptidoglycolipid. Tính đặc hiệu Kiểu (Type) là do kháng nguyên protein tế bào chất. Các kháng nguyên này gồm kháng nguyên 5, kháng nguyên 6, kháng nguyên 14, kháng nguyên 19, kháng nguyên 33, kháng nguyên 38 và kháng nguyên 60.

Protein của mycobacteria có tên là tuberculin, có chức năng phát triển tính quá mẫn cảm được làm trễ (delayed hypersensitivity) ở người sau khi vi khuẩn này xâm nhiễm vào cơ thể. Tuberculin từ người, bò và từ murine của vi khuẩn có kháng nguyên giống nhau. Tuberculin cũng biểu hiện một vài mối quan hệ về kháng nguyên với mycobacterium không điển hình.

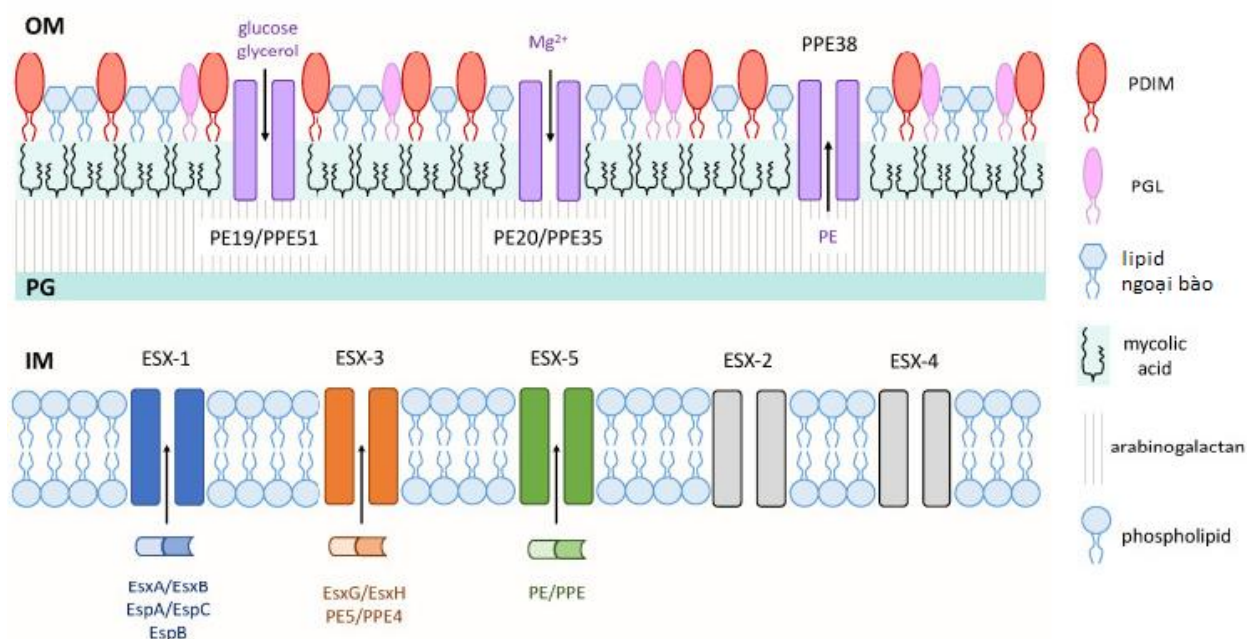
46.8. Phát sinh bệnh và miễn dịch

M. tuberculosis gây bệnh lao, bệnh điển hình do mycobacteria ở người. Khả năng *M. tuberculosis* tăng trưởng trong bên trong các đại thực bào thuộc phế nang là yếu tố chính quyết định độc lực của vi khuẩn.

46.8.1. Yếu tố gây độc

Các yếu tố quyết định độc lực (virulence determinant) của mycobacterium được chia thành các nhóm dựa trên chức năng, đặc tính phân tử của chúng hoặc sự khu trú bên trong nội bào, cụ thể như sau: (1) sự biến dưỡng lipid và acid béo, bao gồm dị hóa

cholesterol, (2) protein vỏ bào tế bào: gồm các protein thành tế bào, lipoprotein và hệ thống tiết, (3) protein ức chế các yếu tố tác động kháng vi sinh vật (antimicrobial effector) của đại thực bào, gồm các protein liên quan đến các phản ứng stress do oxy hóa và phản ứng của tế bào đối với các chất nitric oxide, nitrous oxide hay các nhóm chất tương tự (nitrosative stress), sự bắt giữ thể thực bào và ức chế quá trình chết theo chương trình, (4) protein kinase, (5) protease, bao gồm cả metalloprotease, (6) protein đóng vai trò là yếu tố vận chuyển kim loại (metal-transporter protein) được chia thành yếu nhập và xuất, (7) các yếu tố điều hòa biểu hiện gen, gồm yếu tố sigma và yếu tố điều hòa phiên mã, (8) protein có chức năng chưa biết, gồm PE và nhóm PE-PGRS và (9) các protein gây độc khác (Hình 46.4).



Hình 46.4. Minh họa các yếu tố gây độc của mycobacteria. Ba hệ thống tiết kiểu VII: ESAT-6 hệ tiết -1 (ESX-1), ESX-3 và ESX-5 là những protein tiết ngang qua màng trong IM. Pro-Glu (PE)/Pro-Pro-Glu (PPE) là phân tử nhỏ trên kênh chọn lọc vận chuyển các chất dinh dưỡng và protein qua màng ngoài. Nhiều lipid màng ngoài thành tế bào mycobacterium được mô tả ở phía bên phải của hình; IM: màng trong, OM: màng ngoài, PG: peptidoglycan (nguồn: Angel Ly và Jun Liu).

Các yếu tố quyết định độc tính của *M. tuberculosis* hiện chưa được hiểu nhiều. *M.*

tuberculosis không sản sinh ra bất kỳ độc tố nào. Mặc dù yếu tố thừng (cord factor) và sulfolipid là những chất độc do vi khuẩn tạo ra, nhưng sự tồn tại của những yếu tố này đóng vai trò như là yếu tố độc thì đang được nghi vấn.

(1). Yếu tố thừng (Cord factor): được gọi bằng tên yếu tố thừng là do *M. tuberculosis* tạo ra các sợi uốn éo khi khuẩn này phát triển trên bề mặt môi trường lỏng hay trên môi trường rắn. Ban đầu yếu tố thừng này được cho là yếu tố gây độc nhưng giờ đã được xác định là không phải.

(2). Sulfolipid: sulfolipid nghi ngờ là yếu tố gây độc mặc dù vai trò chính xác của chúng về phát sinh bệnh thì chưa biết. Sulfolipid được phát hiện có liên quan đến độc tính của vi khuẩn lao vì ngăn chặn sự dung hợp của thể thực bào (phagosome) và lysosome bên trong các đại thực bào, nhờ đó cho phép vi khuẩn nhân lên trong đại thực bào. Bệnh lý chính ở mô bị nhiễm do sự xâm nhiễm của mycobacteria gây ra thì chủ yếu là do phản ứng của cơ thể chủ đối với sự xâm nhiễm của *M. tuberculosis* hơn là yếu tố gây độc do vi khuẩn tạo ra.

46.8.2. Phát sinh bệnh lao

Bệnh lao có thể là tiên phát và hậu phát tùy thuộc vào thời gian xâm nhiễm và kiểu phản ứng miễn dịch của cơ thể chủ.

(1). Bệnh lao tiên phát hay lao sơ cấp: bệnh lao tiên phát tiêu biểu cho bệnh khởi phát do *M. tuberculosis* gây ra trong cơ thể chủ bị nhiễm khuẩn này. Bệnh thường phát hiện ở trẻ. Khi hít vào các giọt khí có vi khuẩn, vi khuẩn lao sẽ đi vào tuyến hô hấp dưới. Phần lớn vi khuẩn hít vào sẽ bị tiêu diệt nhờ cơ chế phòng thủ tự nhiên của tuyến hô hấp dưới. Vi khuẩn nào sống sót sau cơ chế phòng thủ này sẽ đi vào phổi và vào các đại thực bào ở túi phổi. Vi khuẩn lao trong thực bào sẽ ức chế sự acid hoá của các túi thực bào và sau đó ngăn chặn sự dung hợp của thể thực bào và tiêu thể (lysosome). Điều này giúp cho vi khuẩn tự do nhân lên hoặc là trong thể thực bào hoặc là trong tế bào chết. Sự nhân lên bên trong của tế bào làm phá huỷ tế bào và phóng thích ra mycobacteria. Cứ thế tiếp tục các chu kỳ tiếp theo bao gồm các bước đại thực bào tiến hành thực bào vi khuẩn, mycobacteria nhân lên và ly giải các đại thực bào.

Một số vi khuẩn được đại thực bào vận chuyển đến hạch bạch huyết rốn. Đại thực

bào được dẫn dụ đến vị trí này do có sự hiện diện của vi khuẩn, thành phần tế bào và các yếu tố hoá ứng động như bổ thể C5a của huyết thanh. Điều này dẫn đến hình thành ổ bệnh gọi là ổ Ghon, ổ này được hình thành từ những tế bào có kích thước lớn chứa nhiều nhân được gọi là tế bào *Langerhans*. Ổ bệnh dạng này thường được phát hiện ở thùy dưới hay phần dưới của thùy trên thuộc phổi. Ổ bệnh này cũng liên quan đến sự trương lên của các hạch bạch huyết rốn. Cả ổ Ghon và hạch bạch huyết rốn tạo nên phức hợp sơ nhiễm (*primary complex*), phức hợp này thường phát triển trong vòng 3 - 8 tuần sau khi cơ thể bị nhiễm vi khuẩn lao. Phức hợp sơ nhiễm ban đầu này liên quan đến sự phát triển tính quá mẫn cảm với độc tố tuberculin của vi khuẩn lao. Bệnh này phần lớn sẽ lành trong vòng 2 - 6 tháng.

Nếu chỉ có một lượng nhỏ vi khuẩn hiện diện thì chúng sẽ bị các đại thực bào phá hủy cùng với đó là gây ra sự tổn thương mô nhỏ nhất. Tuy nhiên nếu có nhiều vi khuẩn hiện diện thì sẽ làm cho mô bị hoại tử. Nhiều yếu tố của cơ thể chủ góp phần cho quá trình hoại tử mô gồm (a) hoạt hóa cục bộ bổ thể, (b) phơi nhiễm với các enzyme thủy giải có nguồn gốc từ đại thực bào, (c) hoạt tính cytokine và (d) các chất trung gian cho phản ứng oxygen. Vi khuẩn này có thể hiện diện ở dạng ngủ yên trong giai đoạn này hoặc có thể tái hoạt hóa khi cơ thể về già, sau khi sử dụng liệu pháp điều trị hay sau khi bị bệnh suy giảm miễn dịch. Tái hoạt hóa của vi khuẩn tại vị trí này sẽ gây ra bệnh lao hậu phát hay còn gọi là lao thứ cấp.

Lao hậu phát hay lao thứ cấp: lao hậu phát là do tái hóa sự xâm nhiễm tiềm tàng của vi khuẩn hay do tái nhiễm từ bên ngoài. Sự tái nhiễm của bệnh lao sơ cấp thường xuất hiện ở những bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch như người bệnh tiếp nhận bộ phận cấy ghép cơ thể, người bị HIV và bệnh nhân lớn tuổi. Bệnh lao thứ cấp khác với bệnh lao sơ cấp ở các đặc điểm sau:

(a). U hạt của lao thứ phát xuất hiện nhiều hơn trong các thùy trên của phổi. Bệnh ở phổi làm cho hoại tử bã đậu (*caseous necrosis*) và phá hủy mô, dẫn đến hình thành các hốc (*cavity*) ở những cơ thể chủ bị suy giảm miễn dịch. Bệnh phát tán rộng trong phổi và các cơ quan khác như thận, xương, màng não,

(b). Các hạch bạch huyết thì liên quan thường xuyên.

(c). Các hốc có thể vỡ ra vào mạch máu làm cho vi khuẩn mycobacteria phát tán vào cơ thể hoặc có thể vỡ ra phát tán vào không khí, làm phóng thích mycobacterium vào các sol khí và đờm.

U lao (tubercle): u lao là bệnh lý chính trong bệnh lao. Đây là trường hợp u lao không mạch (avascular granulomatous). U lao bao gồm vùng ngoại vi gồm lympho bào và nguyên bào sợi và vùng trung tâm gồm các tế bào lớn có hoặc không có hoại tử (caseation). Bệnh chủ yếu gồm kiểu: (a) bệnh lao rỉ dịch và (b) bệnh lao phát sinh (productive tubercular lesion).

Bệnh lao rỉ dịch (*Exudative tuberculous lesion*) là phản ứng viêm cấp tính. Trường hợp này liên quan đến việc gia tăng số lượng bạch cầu đa nhân và sau đó là lympho bào và bạch cầu đơn nhân cũng như sự tích lũy dịch. Trường hợp này thường thấy nhiều ở những bệnh nhân (i) bị nhiễm nhiều trực khuẩn gây bệnh, (ii) có một lượng trực khuẩn gia tăng và (iii) có phản ứng quá mẫn cảm kiểu được làm trễ (DTH) của cơ thể chủ

Bệnh lao phát sinh (*productive tuberculosis lesion*) chủ yếu thuộc tế bào. Có liên quan đến miễn dịch bảo vệ hơn là phản ứng DTH.

46.9. Miễn dịch của cơ thể chủ

M. tuberculosis xâm nhiễm của vào cơ thể chủ bị nhiễm cảm ứng miễn dịch qua trung gian tế bào (CMI). CMI được biểu hiện hoặc là phản ứng siêu mẫn cảm với tuberculin được làm trễ hoặc là kháng lại sự xâm nhiễm. Sự xâm nhiễm được xác định bằng sự tương tác của phản ứng siêu mẫn cảm hoặc của sự miễn dịch.

Phản ứng siêu mẫn cảm với tuberculin: Robert Koch là người mô tả đầu tiên hiện tượng này trong thực nghiệm trên động vật bị nhiễm như chuột lang. Việc chứng minh phản ứng tuberculin này trong chuột lang được gọi là hiện tượng *Koch*. Hiện tượng Koch được chứng minh bằng cách tiêm vào dưới da chủng thuần trực khuẩn u lao gây bệnh vào chuột lang. Khởi đầu, không thấy được phản ứng xảy ra tại vị trí tiêm vào chuột lang. Nhưng sau 10 - 14 ngày, xuất hiện nốt sần cứng (hard nodule) tại vị trí tiêm, nốt này sớm bị vỡ ra gây lở loét tồn tại cho đến khi động vật chết do bệnh lao tiến triển. Hạch bạch huyết vùng trở nên lớn hơn và trông giống dạng bã đậu.

Ngược lại khi cấy trực khuẩn lao vào chuột lang đã được tiêm trực khuẩn lao từ 4 - 6 tuần trước đó, thì vết thương sẽ phát triển tại vị trí tiêm trong vòng 24 - 48 giờ. Tổn thương này trở nên hoại tử trong ngày nào đó để tạo ra vết loét nông nhanh chóng được hàn kín miệng, liên quan đến các hạch bạch huyết vùng và cơ của chúng.

Các điểm lưu ý: hiện tượng Koch là sự kết hợp cả siêu mẫn cảm (hypersensitivity) và miễn dịch, điều này có ba thành phần sau: (a). Phản ứng cục bộ (cứng lại và hoại tử), (b). Phản ứng tâm điểm như gây sung huyết và thậm chí xuất huyết xung quanh điểm lao và (c). Phản ứng toàn thân như gây sốt, phản ứng này thậm chí có thể gây chết. DTH có thể được cảm ứng do vi khuẩn lao còn sống đã được làm yếu hoặc đã chết, sản phẩm của vi khuẩn và protein lao. Thông thường người ta sử dụng vi khuẩn lao còn sống đã được làm yếu hoặc đã chết hoặc sử dụng protein lao là tuberculin để chứng minh phản ứng siêu mẫn cảm. Phản ứng siêu mẫn cảm này có thể được truyền một cách thụ động qua tế bào nhưng lại không qua huyết thanh.

Thử nghiệm tuberculin: thử nghiệm tuberculin là thử nghiệm dùng để chứng minh phản ứng siêu mẫn cảm được làm trễ kiểu IV hay phản ứng siêu mẫn cảm qua trung gian tế bào. Khởi đầu thử nghiệm tuberculin được tiến hành bằng cách sử dụng protein được gọi là tuberculin cũ (OT) do Robert Koch điều chế. OT này là thành phần protein của vi khuẩn lao được điều chế từ *M. tuberculosis* nuôi cấy 6 - 8 tuần trong glycerol 5%, làm tăng hàm lượng lên gấp 10 lần bằng cách cô chân không trên bề điều nhiệt. OT này chính là protein thô, OT gồm protein nhưng dao động từ mẻ này sang mẻ khác về độ tinh khiết và hiệu năng. Ngày nay người ta sử dụng PPD của vi khuẩn lao để thay thế.

Miễn dịch dịch thể: miễn dịch dịch thể có đặc điểm nhờ sự phát triển của kháng thể trong huyết thanh, nhưng miễn dịch dịch thể lại không đóng vai trò nào trong việc hợp nhất miễn dịch để chống lại vi khuẩn. Kháng thể chống lại polysaccharide, protein và kháng nguyên phosphate của vi khuẩn lao đã được chứng minh trong huyết thanh của bệnh nhân bị bệnh lao. Tuy nhiên các kháng thể huyết thanh này không được bảo vệ.

46.10. Hội chứng lâm sàng

Các biểu hiện về hội chứng lâm sàng của bệnh lao phụ thuộc vào vị trí xâm nhiễm. Tuy nhiên xâm nhiễm sơ cấp thường là phổi. *M. tuberculosis* sản sinh ra các hội chứng

lâm sàng sau: (a) lao phổi và (b) lao ngoài phổi.

Lao phổi: ho, sốt và giảm cân là những triệu chứng điển hình của lao phổi. Ho ra máu hay đau ngực, đổ mồ hôi đêm, mệt mỏi và biếng ăn là những biểu hiện khác. Đờm có thể ít hoặc có máu và có mủ là hậu quả và thường có liên quan đến các tổn thương dạng ổ trong phổi. Lao phổi có thể biểu hiện nhiều dạng khác nhau gồm bệnh phổi tiến triển, liên quan đến màng phổi (pleura) và tái hoạt bệnh phổi. Các biến chứng về phổi gồm tái phát, u do nấm aspergillus, chứng giãn phế quản (bronchiectasis), sỏi phế quản (broncholithiasis) và xơ phổi (fibrothorax).

Lao ngoài phổi: lao ngoài phổi xảy ra là do sự lây lan của vi khuẩn lao qua hệ tuần hoàn máu trong giai đoạn đầu của đa biến chứng tại vị trí nhiễm bệnh sơ cấp ví dụ như phổi chẳng hạn. Phụ thuộc vào vị trí xâm nhiễm, nhiễm trùng ngoài phổi có thể là: (a) lao niệu dục, (b) viêm màng não lao, (c) lao dạ dày ruột, (d) lao xương, (e) viêm bạch huyết do lao và (f) các trường hợp khác.

Lao niệu dục: lao niệu dục là một trong những biểu hiện ngoài phổi phổ biến nhất của bệnh lao. Triệu chứng điển hình gồm chứng khó tiểu (dysuria), số lần đi tiểu tăng và đau hông. Trường hợp ở nam có thể biểu hiện như viêm mào tinh hoàn (epididymitis) hoặc tăng bên trong vùng bìu dái. Ở nữ có thể có biểu hiện như viêm vùng chậu. Lao cơ quan niệu dục làm cho khoảng 10% phụ nữ bị bệnh vô sinh.

Viêm màng não lao: đây là một trong những biến chứng quan trọng nhất của bệnh lao. Trường hợp này có thể tồn tại dai dẳng triệu chứng đau đầu, hoặc là từng cơn hoặc là dai dẳng.

Lao dạ dày ruột: biểu hiện lâm sàng của bệnh phụ thuộc vào vị trí bị ảnh hưởng trong tuyến dạ dày ruột. Ví dụ bệnh ở dạ dày ruột hoặc tá tràng có biểu hiện như bệnh loét dạ dày giống như đau bụng, ngược lại bệnh ở ruột già có biểu hiện như đau bụng, tiêu chảy,

Lao xương: xương sống là vị trí phổ biến nhất liên quan đến lao xương dẫn đến bệnh Pott.

Viêm bạch huyết do lao: viêm bạch huyết do lao hay phổ biến nhất là lao hạch (scrofula) liên quan đến cổ dọc theo cơ ức - đòn chũm. Trường hợp này thường về một

phía đau nhẹ hoặc không đau.

Các trường hợp khác: các trường hợp này gồm lao kê, lao ở da và lao ở tai giữa và lao ở cấu trúc mắt.

46.10.1. Biến chứng của bệnh lao

Lao kê, lao phân tán hay rải rác và viêm màng não lao là những biến chứng quan trọng nhất của bệnh lao sơ cấp. Tràn dịch màng phổi (pleural effusion) và tràn khí màng phổi (pneumothorax) được xem là những biến chứng phổi đáng chú ý của bệnh lao. Xuyên ruột, nghẽn ruột và hấp thu kém là những biến chứng lao ở ruột non. Thận ứ nước (hydronephrosis) và chứng tự bẻ thận (autonephrectomy) là những biến chứng về thận, ngược lại chứng liệt hai chân (paraplegia) là biến chứng của bệnh Pott xảy ra ở xương sống.

46.10.2. Bệnh lao và HIV

Bệnh nhân HIV bị bệnh lao thường dễ bị tiến triển thành bệnh phân tán. Các bệnh nhân này thường không bị bệnh phổi hang (cavitary pulmonary disease) hoặc làm thâm nhiễm thùy trên của phổi (upper lobe infiltrate). Bệnh nhân bị bệnh lao và những bệnh nhân bị bệnh HIV cần phải kiểm tra lao định kỳ bằng thử nghiệm tuberculin trên da và chụp X quang ngực. Bệnh nhân HIV dương tính với tuberculin trên da (TST) thường phát triển lao hoạt động ở tốc độ 3 - 16%/ năm.

HIV tái hoạt bệnh lao âm ỉ làm cho bệnh nghiêm trọng hơn và làm cho việc điều trị trở nên khó khăn hơn và không hiệu quả. Bệnh nhân bị bệnh cả HIV và lao khi được điều trị bằng liệu pháp kháng retrovirus sẽ phát triển nhiều biểu hiện lâm sàng gồm sốt, viêm hạch bạch huyết và thâm nhiễm phổi không xâm lấn. Điều này được cho là do phản ứng miễn dịch mạnh mẽ hơn đối với *M. tuberculosis*.

46.11. Dịch tễ học

Lao là một trong những bệnh truyền nhiễm gây chết người có mặt khắp nơi trên thế giới.

46.11.1. Phân bố về địa lý

Một phần ba dân số thế giới bị nhiễm *M. tuberculosis*. Gần hai phần ba tất cả các trường hợp bệnh lao xảy ra ở các nước đang phát triển gồm Việt Nam, Ấn độ, Pakistan,

Trung Quốc, Bangladesh, Philippines, Indonesia, Thailand và Congo. Gần 3 triệu người chết vì bệnh lao mỗi năm và có đến gần 2 tỷ người bị lao âm ỉ.

46.11.2. Môi trường sống

M. tuberculosis sống chủ yếu trong tuyến hô hấp của người bị nhiễm. Các giọt khí nhỏ có cả *M. tuberculosis* đã được tìm thấy ở không gian cuối của phổi.

46.11.3. Nguồn ẩ n nấu, nguồn lây nhiễm và sự lan truyền

Con người chỉ là nguồn ẩ n nấu, cung cấp cho vi khuẩn *M. tuberculosis*. Sự lây nhiễm của nguồn cung cấp là vấn đề quan trọng trong việc xác định khả năng lan truyền bệnh. Điều này phụ thuộc vào lượng trực khuẩn và cũng phụ thuộc vào hình thái của tổn thương. Các tổn thương có thể hàng chứa 100 - 10.000 trực khuẩn vì vậy các trường hợp bị tổn thương thể hang có khả năng là nguồn xâm nhiễm cao. Các trường hợp được điều trị bằng liệu pháp kháng lao thì khả năng xâm nhiễm sẽ ít hơn so với những trường hợp không được điều trị bằng thuốc kháng lao. Sự xâm nhiễm này giảm đi chủ yếu là do giảm lượng trực khuẩn có trong phổi.

Con người mắc phải *M. tuberculosis* chủ yếu do hít phải các giọt khí có yếu tố xâm nhiễm. Các giọt xâm nhiễm này thường là do người bị bệnh lao phổi ho, hắt xì vào trong môi trường. Các hoạt động như ho, hắt xì, nói chuyện sẽ phóng thích 3.000 nhân giọt khí qua đường không khí/ 1 lần ho. Nhân giọt khí thì nhỏ, kích thước chừng 5 µm hoặc nhỏ hơn và chứa khoảng 1 - 10 trực khuẩn lao. Về lý thuyết, mặc dù chỉ cần một trực khuẩn lao riêng lẻ có thể gây bệnh, nhưng trong thực tế để sự xâm nhiễm xảy ra cần phải hít vào từ 5 - 200 tế bào vi khuẩn. Những giọt khí có nhân nhỏ này sẽ lơ lửng trong không khí trong một thời gian rất dài. Sự xâm nhiễm mắc phải hiếm khi do bị cấy vào.

M. bovis lan truyền sang người do tiêu thụ phải sữa bò tươi bị nhiễm *M. bovis*. Lây nhiễm giữa động vật với nhau được lan truyền qua các sol khí có vi khuẩn do bò ho hoặc hắt hơi. Động vật bị nhiễm thường tiết vi khuẩn vào sữa. Lan truyền *M. bovis* giữa người với người thường không xảy ra.

Các yếu tố nguy cơ của bệnh lao: xâm nhiễm chủ yếu xảy ra ở phổi là do cơ thể hít phải các sol khí có vi khuẩn lao xâm nhiễm. Nguy cơ bệnh phụ thuộc vào sự phơi nhiễm với tia UV và sự thông khí; vì vậy khả năng xâm nhiễm xảy ra nguy cơ cao ở các

phòng nhỏ và phòng có thông khí kém. Có nhiều yếu tố nguy cơ của bệnh lao:

- 1) HIV là một trong những yếu tố nguy cơ quan trọng nhất. Tỷ lệ mắc bệnh (case rate) của những cá thể bị nhiễm với cả HIV và *M. tuberculosis* thì có nguy cơ bị *M. tuberculosis* xâm nhiễm cao hơn nhiều so với những người không bị nhiễm HIV.
- 2) Các yếu tố khác làm gia tăng nguy cơ bị bệnh lao là sử dụng liệu pháp hóa học điều trị ung thư, ác tính và dinh dưỡng kém. Trường hợp sau làm thay đổi CMI và vì vậy thường làm gia tăng bệnh lao ở những người bị mất công dụng.
- 3) Người có ít kháng nguyên kiểu HLA sẽ tăng nhạy cảm với bệnh lao mắc phải. Các yếu tố di truyền như sự hiện diện của gen *Bcg*, cũng có bản chất bị bệnh lao.
- 4) Các yếu tố không phải lao như ho gà (pertussis), thủy đậu (varicella) và sởi (measles), có thể tái hoạt hóa trạng thái im ắng của *M. tuberculosis* đã nhiễm vào cơ thể.

Nhiễm vào động vật có vú: *M. tuberculosis* chủ yếu xâm nhiễm tự nhiên vào người. Vi khuẩn này cũng có thể gây xâm nhiễm tự nhiên vào động vật linh trưởng, chó và động vật khác tiếp xúc gần với con người bị nhiễm. Trong thực nghiệm xâm nhiễm, *M. tuberculosis* xâm nhiễm cao vào chuột lang và chuột hamster nhưng thường không gây bệnh cho bò, dê, mèo và thỏ. Chuột thì nhạy cảm tương đối trung bình. *M. bovis* gây bệnh nhiều hơn cho động vật. Trục khuẩn này gây lao ở gia súc cũng như ở người và động vật linh trưởng khác. Về mặt thực nghiệm khuẩn này gây bệnh cho chuột lang cao, bê và chuột và không gây bệnh cho điều cầm (fowl).

Các chủng Hoa Kỳ hay *M. africanum* là những những chủng trực khuẩn u lao được phân lập chủ yếu từ Châu Phi. Các type Châu Á (Asian) có độc lực thấp hơn khi thử nghiệm trên chuột lang, nhạy cảm với hydrogen peroxide, kháng được INH và thường phân lập từ Nam Ấn Độ. Các chủng Asian cũng đã được phân lập từ các quốc gia Asian khác và quốc gia ngoài Asian. Đặc điểm khác nhau của nhiều chủng *M. tuberculosis* được tóm tắt trong Bảng 46.2.

46.12. Phát hiện tại phòng thí nghiệm

Chẩn đoán lâm sàng bệnh lao được hỗ trợ từ kết quả của phòng thí nghiệm và các

thử nghiệm khác bao gồm chứng cứ chụp X quang bệnh phổi. Chẩn đoán mang tính quyết định được thực hiện nhờ phát hiện *M. tuberculosis* từ các mẫu lâm sàng bằng cách soi dưới kính hiển vi hay nuôi cấy.

46.12.1. Mẫu thử

Thu thập mẫu thử phụ thuộc vào đặc điểm của bệnh hoặc là trong phổi hoặc là ngoài phổi. Đờm, mô phổi, dịch rửa dạ dày và dịch rửa phế quản là những mẫu được thu thập để chẩn đoán bệnh lao phổi. Dịch não tủy (CSF), dịch màng phổi, dịch màng bụng, nước tiểu, mô hạch bạch huyết, tủy xương và máu là những mẫu khác dùng để chẩn đoán lao ngoài phổi. Nhìn chung một chỉ có số ít trực khuẩn lao có trong mẫu thu thập ngoài phổi so với có trong mẫu đờm.

(1). Đờm là mẫu lựa chọn cần thu thập đối với người nghi ngờ bị bệnh lao phổi. Lưu ý là thu thập mẫu đờm vào buổi sáng, chứ không phải nước miếng, vào vật chứa sạch có miệng rộng như cốc thu nhận đờm chẳng hạn. Thu thập mẫu đờm vào buổi sáng là lý tưởng. Nếu mẫu đờm quá ít, có thể cần thu thập thêm trong 24 giờ. Nếu mẫu đờm thu thập liên tục trong ba ngày sẽ gia tăng cơ hội phát hiện trực khuẩn lao.

(2). Dịch rút dạ dày có thể được sử dụng để thay thế mẫu đờm, nhất là đối với trẻ nhỏ là những đối tượng thường không tạo ra đờm. Ở những trẻ lớn hơn, có thể thu thập chất tiết cuống phổi bằng cách kích thích tạo ra ho nhờ sử dụng dung dịch khí propylene glycol trong sodium chloride 10%. Dịch rửa phế quản cũng có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh lao phổi.

(3). Nước tiểu là mẫu được lựa chọn để chẩn đoán lao cơ quan niệu dục. Mẫu được thu thập hoặc ba mẫu liên tiếp vào buổi sáng sớm hoặc một mẫu nước tiểu được bài tiết ra trong 24 giờ.

Thu thập mẫu nước tiểu vào vật chứa vô trùng sạch, rộng có dung tích 500 mL hoặc lớn hơn và chuyển ngay về phòng thí nghiệm để xử lý phân tích. Mẫu nước tiểu được ly tâm ở tốc độ 300 rpm trong 30 phút và thu thập chất lắng để nuôi cấy trên môi trường chọn lọc nhằm phân lập *M. tuberculosis*.

(4). Thu thập CSF dùng để chẩn đoán viêm màng não lao. Ly tâm CSF và chất rắn sau ly tâm được nhuộm trải và cấy trên môi trường nuôi cấy. CSF để yên trong thời gian

dài sẽ phát triển thành mạng nhện, kiểm tra dung dịch này cho thấy có nhiều trực khuẩn hơn.

(5). Dịch màng phổi (pleural fluid), dịch màng bụng (peritoneal fluid) và các chất tiết khác được thu thập vào các vật chứa có citrate để ngăn chặn sự đông tụ. Tủy xương và cơ gan thường được thu thập từ bệnh nhân bị lao kê (miliary tuberculosis), máu được thu thập từ bệnh nhân bị HIV dùng để phân lập nuôi cấy vi khuẩn.

Điều quan trọng là tất cả các mẫu bệnh phẩm này phải được thu thập trước khi bắt đầu liệu pháp kháng lao. Mẫu sau thu thập cần chuyển ngay về phòng thí nghiệm để nhuộm và nuôi cấy. Trong trường hợp không thể vận chuyển ngay, mẫu cần giữ ở 4°C nhưng không để qua đêm. Mẫu sau thu thập nếu để quá lâu sẽ làm giảm khả năng phân lập trực khuẩn lao bằng phương pháp nuôi cấy.

46.12.2. Soi dưới kính hiển vi

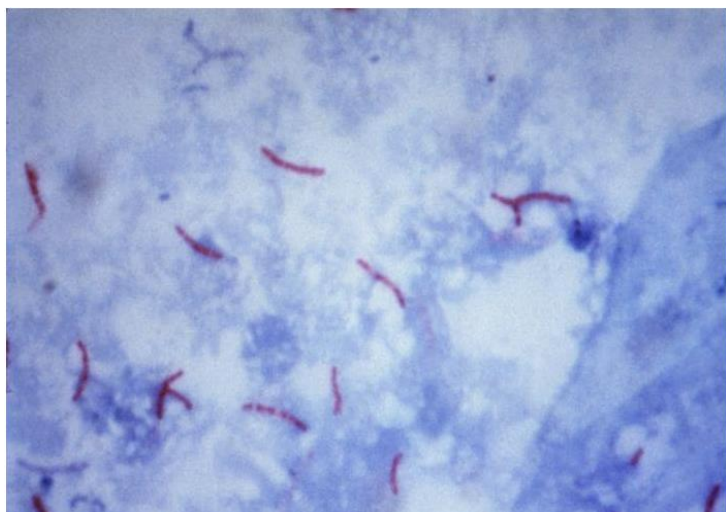
Soi mẫu đờm dưới kính hiển vi là phương pháp đáng tin cậy nhất và cũng là phương pháp truyền thống dùng để chứng minh có vi khuẩn AFB bằng cách nhuộm ZN. Mỗi lần nhuộm mẫu đờm cần sử dụng lam mới để trải khuẩn. Không được tái sử dụng lam đã qua xét nghiệm vì AFB có thể còn dính trên bề mặt lam và không bị loại bỏ trong quá trình làm sạch lam.

Mẫu kính phết được làm từ phần có mũ của mẫu đờm và sau đó được làm khô, cố định bằng nhiệt và nhuộm bằng kỹ thuật ZN. Soi mẫu kính phết dưới len kính hiển vi nhúng dầu (100X). Khuẩn acid-fast trong kính phết nhuộm sẽ có màu đỏ sáng tương phản với nền có màu xanh da trời. Ít nhất có 5×10^4 đến 10^5 trực khuẩn/ ml dịch đờm để xét nghiệm, để khoảng 10 phút trước khi báo cáo kết quả âm tính. Sự có mặt của ít nhất hai hoặc nhiều hơn hai trực khuẩn điển hình trong mẫu kính phết được xem là AFB dương.

Mẫu kính phết (smear) được phân loại phụ thuộc vào số trực khuẩn hiện diện trong mẫu được nhuộm để soi dưới ống kính có nhúng dầu.

Điểm lưu ý mẫu kính phết được sử dụng: (a). Trong đánh giá định lượng số trực khuẩn trong mẫu đờm (Bảng 46.3); (b). Để đánh giá sự xâm nhiễm vào bệnh nhân; (c). Để giám sát tính hiệu quả của liệu pháp kháng mycobacteria và (d). Để xác định tính không liên tục trong phân lập vi khuẩn hô hấp.

Chứng minh AFB dưới kính hiển vi qua mẫu kính phết nhuộm là phương pháp chẩn đoán lao giả định. Điều này là do nhuộm ZN kính phết AFB không thể được sử dụng để phân biệt *M. tuberculosis* với các vi khuẩn acid-fast khác như mycobacteria hoại sinh hay *Nocardia* species.



Hình 46.4. Ảnh *M. tuberculosis* nhuộm Ziehl-Neelsen dưới kính hiển vi (1000X). Nhuộm acid-fast phụ thuộc vào khả năng mycobacteria lưu giữ chất nhuộm khi được xử lý với acid kháng hay dung dịch acid-alcohol như chất nhuộm Ziehl-Neelsen hay Kinyoun là phương pháp nhuộm

carbolfuchsin chuyên biệt cho *M. tuberculosis*.

Mycobacteria hoại sinh có thể hiện diện với hình dạng giống như *M. tuberculosis*. Khi nhuộm mycobacteria hoại sinh có hình dạng giống nhau nhưng không có bất kỳ dạng chuỗi hạt (beaded appearance) và thường chỉ có acid fast nhưng alcohol fast thì không. Hơn nữa mycobacteria hoại sinh không có trong mẫu đờm và các chất tiết hô hấp khác nhưng lại được tìm thấy trong mẫu niệu dục, dịch dạ dày và mẫu phân.

Các chất nhuộm auramine - rhodamine là những chất phát huỳnh quang được sử dụng như là chất cải biên của chất nhuộm ZN truyền thống trong chứng minh AFB. Trong phương pháp này, mẫu kính phết được nhuộm với các chất nhuộm phát huỳnh quang auramine - rhodamine hoặc auramine - phenol và được kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang dưới ánh sáng UV. Khi đó AFB xuất hiện dưới dạng hình que phát huỳnh quang sáng đối ngược với nền tối. Do hiệu ứng tương phản, trực khuẩn được nhìn thấy ngay cả dưới vật kính phân giải cao, ngược lại với vật kính nhúng chìm ở trường hợp nhuộm ZN, nên có khả năng sàng lọc nhanh ở khu vực kính phết lớn hơn. Các kính phát hiện vi khuẩn nhuộm huỳnh quang này có thể được sàng lọc nhanh hơn do AFB nổi lên ngược với nền không phát quang. Đây là điểm thuận lợi chính của phương pháp nhuộm

này, vì vậy được chấp nhận ở những phòng thí nghiệm nơi có nhiều mẫu kính phết cần kiểm tra AFB. Tuy nhiên, phương pháp này luôn luôn cần khẳng định lại các mẫu kính phết dương tính với chất phát huỳnh quang bằng nhuộm ZN.

Soi kính hiển vi mẫu đờm có thể không phát hiện bệnh ở giai đoạn sớm hoặc ở những trẻ có chất tiết hô hấp ít.

Bảng 46.3. Phân loại kết quả nhuộm AFB bằng kỹ thuật ZN.

Dưới kính hiển vi nhuộm chìm bằng dầu	Số lượng AFB	Tổng hợp kết quả
1 Field	10 hoặc nhiều hơn	4 +
1 Field	1- 9	3 +
10 Field	1- 9	2 +
100 Field	1- 9	1 +
300 Field	1- 2	Nghi ngờ; lặp lại mẫu kính phết
300 Field	0	Không nhìn thấy AFB
AFB, trực khuẩn acid-fast		

Cô đặc mẫu: phương pháp cô đặc được mô tả để cô đặc mycobacteria trong đờm và các mẫu khác. Bằng phương pháp này, mẫu được khử nhiễm và cô đặc vào trong thể tích nhỏ nhưng không làm bất hoạt vi khuẩn. Chất lắng cô đặc được sử dụng để soi dưới kính hiển vi cũng như dùng cho nuôi cấy và cấy vào động vật. Một số phương pháp hiện được sử dụng bao gồm như sau:

Phương pháp Petroff: đây là phương pháp đơn giản và được sử dụng rộng rãi. Trong phương pháp này, trộn đều một lượng thể tích cân bằng giữa dịch đờm và dung dịch sodium hydroxide 4% và ủ ở 37°C có chế độ lắc cho đến khi dung dịch trong bình chứa trở nên trong, trung bình khoảng 20 phút. Sau đó đem ly tâm 3.000 rpm/ 30 phút. Loại bỏ phần nổi và phần lắng đem trung hòa bằng cách thêm hydrochloric acid 8%. Phenol red được sử dụng làm chỉ thị.

Phương pháp khác: phương pháp khác để cô đặc mẫu như sử dụng acid loãng như sulfuric acid 6%, oxalic acid 5%, hay hydrochloric acid 3% hoặc yếu tố mucolytic như *N*-acetyl-L-cysteine cùng với sodium hydroxide và pancreatin, desogen, zephiran và

cetrimide để cô đặc mẫu.

46.12.3. Nuôi cấy

Nuôi cấy là phương pháp quyết định để phát hiện và xác định *M. tuberculosis*. Nuôi cấy cũng là phương pháp chẩn đoán nhạy hơn so với soi mẫu kính phết dưới kính hiển vi. Nuôi cấy có thể cho kết quả dương khi tế bào vi khuẩn ở nồng độ thấp 10 - 100 AFB/ mm mẫu đã được làm đặc. Điểm thuận lợi khác của nuôi cấy đó là giúp định danh các loài chuyên biệt và dùng để xác định kiểu nhạy cảm với kháng sinh của các chủng phân lập.

Môi trường LJ là môi trường có thành phần cơ bản là trứng và môi trường Middlebrook 7H10 và 7H11 là những môi trường thạch cơ bản và những môi trường này là môi trường truyền thống được sử dụng trong nuôi cấy khuẩn. Do *M. tuberculosis* tăng trưởng chậm, nên trên môi trường truyền thống chúng đòi hỏi thời gian từ 6 - 8 tuần ở 37°C để hình thành khuẩn lạc. Sự tăng trưởng của hầu hết các chủng *M. tuberculosis* có thể xuất hiện trong thời gian này. Tuy nhiên khi nuôi cấy các mẫu âm cần quan sát trong vòng 12 tuần.

46.12.4. Xác định vi khuẩn

M. tuberculosis được xác định bằng nuôi cấy và thử nghiệm sinh hóa. *M. tuberculosis* có phản ứng catalase dương yếu, nitrate dương, khử niacin và tăng trưởng chậm nên cần thời gian 4 - 6 tuần để hình thành khuẩn lạc trên môi trường thạch. Khác biệt giữa *M. tuberculosis* và *M. bovis* được tóm tắt tại Bảng 46.4.

Thử nghiệm niacin: thử nghiệm được tiến hành bằng cách thêm 1 mL nước muối thanh trùng vào khuẩn lạc *M. tuberculosis* trên môi trường LJ. Môi trường này được giữ ở vị trí nghiêng nên các khuẩn lạc của mycobacterium được nước muối phủ hoàn toàn. Sau đó lấy 0,5 mL của dịch cho vào ống nghiệm sạch có nắp vặn. Cho vào dịch này 0,5 mL alcoholic aniline và 0,5 mL cyanogen bromide 10%. Màu vàng xuất hiện trong vài phút biểu thị cho kết quả dương. *M. tuberculosis* có niacin âm nên thử nghiệm không xuất hiện màu vàng trong dịch thử.

Thử nghiệm arylsulfatase: thử nghiệm này được tiến hành ở mycobacteria đang nuôi trên môi trường có tripotassium phenolphthalein disulfate 0,001 M. *Mycobacterium*

species sản sinh ra enzyme arylsulfatase phân cắt tripotassium phenolphthalein disulfate để phóng thích ra phenolphthalein tự do. Phenolphthalein tự do này được phát hiện bằng cách cho thêm sodium hydroxide 2N vào chủng nuôi cấy. Khi màu vàng xuất hiện biểu thị cho phản ứng dương. *M. tuberculosis* không có arylsulfatase, ngược lại một số *Mycobacterium* khác có arylsulfatase.

Thử nghiệm neutral red: thử nghiệm này được tiến hành để phát hiện khả năng một số chủng mycobacteria kết nối với neutral red trong dung dịch đệm alkaline. Trong thử nghiệm này lấy một hoặc hai khuẩn lạc mycobacteria đang tăng trưởng trên môi trường LJ cấy vào 5 mL ethyl alcohol trong chai có nắp vặn. Ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau đó cẩn thận loại bỏ phần nổi alcohol và chuyển sang chai khác có 5 mL nước cất và thêm 0,2 mL dung dịch neutral red 0,05%. Tiếp đến nhỏ từng giọt sodium hydroxide N/100 cho đến khi màu của dung dịch trở thành màu hổ phách (amber). Sau đó ủ ở 37°C trong 1 giờ ở bể điều nhiệt có lắc. Màu hồng hoặc đỏ xuất hiện trong dung dịch có màu hổ phách được xem là kết quả dương. *M. tuberculosis* và *M. bovis* có neutral red dương.

Thử nghiệm catalase: thử nghiệm này được tiến hành để phát hiện enzyme catalase do nhiều loài *Mycobacterium* sản sinh ra. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách trộn vừa đủ thể tích của hydrogen peroxide 30% và Tween 80 10% vào ống nghiệm. Sau đó dùng que cấy vòng nichrome dích khuẩn lạc mycobacteria vào ống nghiệm có chứa hỗn hợp trên. Quan sát bong bóng khí hình thành trong vòng 1 phút. Việc xuất hiện bong bóng khí chỉ thị cho kết quả dương. Nếu nếu bong bóng khí xuất hiện trong dung dịch ngay tức thì, thì thử nghiệm được xem là dương tính mạnh, nhưng nếu bong bóng khí xuất hiện chậm, thì thử nghiệm được xem là dương tính yếu. Không có bong bóng khí được xem là âm tính. *M. tuberculosis* và *M. bovis* có catalase dương yếu. Trục khuẩn này mất hoạt tính catalase khi chúng phát triển khả năng kháng INH.

Thử nghiệm amidase: thử nghiệm này phát hiện khả năng của một số mycobacteria phân cắt các amide như acetamide, nicotinamide, pyrazinamide, carbamide và benzamide. Thử nghiệm này được tiến hành bằng cách cấy 0,00164 M dung dịch amide với mycobacteria và ủ ở 37°C. Sau đó thêm 0,1 mL manganese sulfate, 1 mL dung dịch phenol và 0,5 mL dung dịch hypochlorite. Sau đó ống nghiệm chứa hỗn hợp trên

được giữ ở nước sôi trong bể điều nhiệt trong 20 phút. Kết quả dương khi phát hiện thấy màu xanh da trời trong dung dịch. *M. tuberculosis* có amidase dương, sản sinh enzyme nicotinamidase và pyrazinamidase.

Thử nghiệm khử nitrate: thử nghiệm này phát hiện sự có mặt của enzyme nitrate reductase do *M. tuberculosis* và các loài *Mycobacterium* khác sản sinh ra. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách thêm khuẩn lạc mycobacteria vào dung dịch đệm có chứa nitrate và ủ ở 37°C/ 2 giờ. Sau khi ủ, thêm dung dịch sulfanilamide và *N*-naphthyl-ethylene diamine hydrochloride. Khi có màu hồng hoặc đỏ xuất hiện trong vòng 30 - 60 giây được xem là dương tính. *M. tuberculosis* và các loài mycobacteria khác có nitrate reductase dương, *M. bovis* và *M. avium* thì âm.

Bảng 46.4. Đặc điểm khác nhau của *Mycobacterium tuberculosis* và *M. bovis*.

Đặc điểm	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
Dưới kính hiển vi	Mảnh mảnh hoặc dạng hình que cong nhẹ dạng chuỗi hạt (beaded appearance)	Thẳng, to khỏe, ngắn và có dạng hình que đồng dạng
Nhu cầu oxygen	Hiếu khí bắt buộc	Vi hiếu khí khi phân lập ban đầu nhưng trở nên hiếu khí khi cấy chuyển
Thời gian hình thành khuẩn lạc 37°C	Cần 12 - 25 ngày, tăng trưởng tốt	Cần 20 - 40 ngày, tăng trưởng kém
Ảnh hưởng của glycerol (0,75%)	Khuếch đại tăng trưởng	Ức chế tăng trưởng
Khuẩn lạc	Khuẩn lạc ráp, dai, có màu trắng đến màu da bò	Khuẩn lạc nhẵn, dẹt, dễ vỡ, ẩm ướt
Khử nitrate	+	-
Sản sinh niacin	+	-
Thủy giải Tween 80	Dao động	-
Nhạy cảm với	+	-

pyrazinamide (50

µg/mL)

Tính gây bệnh trên +

chuột lang

Tính gây bệnh trên thỏ - +

Thủy giải Tween 80: thử nghiệm này được tiến hành để chứng minh enzyme lipase được một số loài mycobacteria sản sinh ra. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách thêm một khay cấy vòng dịch khuẩn mycobacterium qua nuôi cấy vào dung dịch có chứa Tween 80, đệm và chỉ thị neutral red. Sau khi cấy ủ ở 37°C và quan sát phản ứng lần đầu sau 3 - 6 giờ, sau đó vào ngày thứ ba và sau đó là hằng ngày cho đến 10 ngày. Khi xuất hiện màu hồng cho thấy có thủy giải Tween 80. *M. tuberculosis* biểu hiện kết quả dao động. *M. kansasii* có phản ứng dương trong vòng 3 - 6 giờ, trong khi các loài mycobacteria khác cho kết quả dương trong vòng 3 - 10 ngày.

Thử nghiệm phân biệt NAP: thử nghiệm này được dựa trên nguyên tắc thêm *p*-nitro acetyl-amino-hydroxyl-propionophenone (NAP) để ức chế sự tăng trưởng của *M. tuberculosis* cũng như *M. bovis* và *M. africanum*. Chất này không ức chế các loài *Mycobacterium* khác tăng trưởng.

Thử nghiệm pyrazinamide: *M. tuberculosis* nhạy cảm với 50 µg/mL pyrazinamide và khuẩn này có enzyme pyrazinamidase. *M. bovis* không có pyrazinamidase.

Nhạy cảm với TCH: *M. tuberculosis* kháng được 10 µg/mL TCH, ngược lại *M. bovis* thì nhạy cảm với TCH.

Đặc điểm xác định *Mycobacterium tuberculosis* được tóm tắt như sau:

- (1). Là trực khuẩn acid-fast có hình dạng thẳng hoặc cong nhẹ.
- (2). Trên môi trường LJ sau 4 - 6 tuần ủ, vi khuẩn tăng trưởng chậm, hình thành khuẩn lạc màu trắng đến màu da bò, thô, xù xì, nhô lên, không đều.
- (3). Tăng trưởng tốt.
- (4). Có phản ứng catalase dương yếu.
- (5). Phản ứng neutral red cho kết quả dương.

- (6). Phản ứng amidase dương.
- (7). Có khả năng khử nitrate.
- (8). Pyrazinamidase dương.
- (9). Có niacin âm.
- 10). Arylsulfatase âm và
- (11). Nhạy cảm với pyrazinamide 50 mg/mL.

46.12.5. *Mycobacteria* nhạy cảm với kháng sinh

Với tình trạng nổi lên của mycobacteria đa kháng thuốc (MDR), việc xác định tính nhạy cảm với thuốc có ý nghĩa quan trọng giúp sử dụng liệu pháp điều trị thích hợp. Nhạy cảm với thuốc có thể được chứng minh bằng cả (a) phương pháp xác định tính nhạy cảm theo kiểu hình và (b) phương pháp xác định nhạy cảm theo kiểu gen.

(a). Xác định nhạy cảm theo kiểu hình gồm (i) phương pháp tỷ số kháng (resistance ratio), (ii) phương pháp nồng độ tuyệt đối (absolute concentration), (iii) phương pháp từng phần (proportion method) và (iv) phương pháp đo bức xạ (radiometric method).

(b). Phương pháp di truyền gồm (i) giải trình tự DNA, (ii) lai trên pha rắn và (iii) PCR.

46.12.6. Chẩn đoán bằng huyết thanh

Sự xâm nhiễm của *M. tuberculosis* liên quan với mức gia tăng của kháng thể trong huyết thanh. Nhiều kháng nguyên mycobacteria được sử dụng trong các thử nghiệm huyết thanh, chúng gồm BCG, 5 và các protein 6 kDa của *M. tuberculosis*, protein 32 kDa và 64 kDa của *M. bovis*, Việc phát hiện kháng thể bằng thử nghiệm huyết thanh như sử dụng phương pháp ELISA, thì có giá trị giới hạn trong chẩn đoán lao phổi. Ngưng kết latex sử dụng các hạt latex có phủ kháng thể chống lại *M. tuberculosis* được sử dụng để chứng minh kháng nguyên có trong CSF dùng để chẩn đoán viêm màng não lao.

46.12.7. Cấy vào động vật

Cấy mẫu bệnh phẩm đã được cô đặc vào cơ đùi của hai con chuột lang khỏe mạnh 12 tuần tuổi. Quan sát thấy chuột giảm cân và có phản ứng tuberculin trên da cho kết quả dương được xem là xâm nhiễm đã diễn ra. Một trong hai con chuột sẽ chết sau 4 tuần.

Xâm nhiễm diễn ra khi khám nghiệm tử thi động vật cho thấy tổn thương bã đậu (caseous lesion) tại vị trí cấy khuẩn. Đôi khi tổn thương bã đậu cục bộ có thể liên quan với sự hình thành mủ xanh (pus) tại vị trí tổn thương của da và mở rộng sang hạch bạch huyết. Lách, gan, phúc mạc và phổi phát triển u lao có kích thước 1 - 2 mm. Nhuộm kính phết dịch rĩ soi dưới kính hiển vi cho thấy có AFB. *M. tuberculosis* là khuẩn gây bệnh cao ở chuột lang, trong các chủng có catalase âm, kháng INH biểu hiện gây bệnh thấp cho chuột lang. *M. tuberculosis* không gây bệnh cho thỏ. Còn *M. bovis* gây bệnh cho cả thỏ và chuột lang.

46.12.8. Thử nghiệm tuberculin trên da

Thử nghiệm tuberculin trên da (TST) là thử nghiệm được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán lao:

(1). Thử nghiệm này được sử dụng để đánh giá các trường hợp bị bệnh lao và để chẩn đoán các trường hợp có nghi ngờ bị nhiễm *M. tuberculosis*.

(2). TST được sử dụng để chẩn đoán xâm nhiễm lao đang hoạt động ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ.

(3). Thử nghiệm này cũng được sử dụng để lựa chọn quần thể nhạy cảm với vaccin BCG (bacille Calmette-Guerin).

(4). TST là thử nghiệm có giá trị để đo mức độ phổ biến của bệnh lao trong cộng đồng.

TST có thể được tiến hành theo các phương pháp sau:

Thử nghiệm mantoux: thử nghiệm mantoux là một phương pháp khuyến cáo sử dụng để thử nghiệm trên da. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng kim tiêm 27-G để tiêm vào trong da 0,1 mL hoặc 5 đơn vị tuberculin (TU) PPD vào mặt trong của cánh tay. Điều quan trọng là PPD phải được tiêm vào giữa các lớp của da, nhưng không được tiêm vào dưới da.

Sau 48 - 72 giờ phát triển vết co cứng (induration) có kích thước 10 mm hoặc lớn hơn tại vị trí tiêm được xem là thử nghiệm dương. Kích thước co cứng < 5 mm được xem là âm, ngược lại giữa 6 và 9 mm được xem là nghi ngờ. Ban đỏ (erythema) không được xem là kết quả của thử nghiệm.

Nếu thử nghiệm PPD cho kết quả âm ở 5 TU, thì có thể thử nghiệm PPD lặp lại ở 10 hoặc 100 TU. Dẫn xuất protein tinh sạch (PPD) của 1 TU được sử dụng khi người nhận được xem như cực kỳ mẫn cảm với kháng nguyên này.

Thử nghiệm đa lỗ trên da (multiple puncture test): thử nghiệm này gồm thử nghiệm Heaf và thử nghiệm time. Thử nghiệm Heaf được tiến hành bằng cách sử dụng súng bắn (hit gun) và sử dụng các chĩa (prong) xài một lần mang PPD khô. Thử nghiệm này có thể phù hợp để sàng lọc và khảo sát nhưng không sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán bệnh vì chúng thiếu đi độ nhạy và độ đặc hiệu.

Thử nghiệm trên da cho kết quả dương cho thấy sự quá mẫn cảm (hypersensitivity) của cá thể đó với protein tubercle. Điều này cho thấy có sự xâm nhiễm *M. tuberculosis* hoặc có tiêm chủng vaccine BCG trong hiện tại hoặc trong quá khứ có bệnh hoặc không. TST sẽ cho kết quả dương 4 - 6 tuần sau khi xâm nhiễm hoặc tiêm chủng. Kết quả biểu hiện dương tính của thử nghiệm tubercle sẽ dần dần biến mất trong vòng 4 - 5 năm khi không có sự tái phơi nhiễm với trực khuẩn lao. Ở những vùng xảy ra dịch cục bộ (endemic), kết quả dương tính này vẫn duy trì do có sự phơi nhiễm với trực khuẩn lao lặp lại.

Thử nghiệm cho kết quả âm biểu thị người xét nghiệm chưa bao giờ tiếp xúc với trực khuẩn lao. TST có thể cho phản ứng dương tính giả và âm tính giả:

(1). Phản ứng dương tính giả xuất hiện ở bệnh nhân bị nhiễm vi khuẩn mycobacteria không phải lao từ môi trường.

(2). Phản ứng âm tính giả có thể xảy ra ở bệnh nhân (a) có tiêm vaccine, (b) sử dụng liệu pháp làm ức chế miễn dịch (immunosuppressive therapy), (c) có CMI bị khiếm khuyết, (d) bị ác tính mô lưới bạch huyết (lymphoreticular malignancies), (e) khiếm khuyết về miễn dịch (immunodeficiency), (f) bị suy dinh dưỡng (malnutrition) và (g) bị lao kê (miliary tuberculosis). Các biện pháp sử dụng thuốc không đúng cách như tiêm PPD vào dưới da hoặc tiêm quá ít kháng nguyên, PPD bị nhiễm, hoặc do bảo quản không đúng cách là những yếu tố khác có thể làm tăng phản ứng âm tính giả.

46.12.9. Phương pháp nhanh và tự động

Các phương pháp truyền thống thì rất chậm và tốn thời gian, đòi hỏi từ 6 - 8 tuần

để phân lập *M. tuberculosis*. Vì vậy ngày nay nhiều phương pháp nhanh và tự động được sử dụng ngày càng tăng để chẩn đoán lao. Các phương pháp hiện nay gồm phương pháp nuôi cấy đo bức xạ tự động (automated radiometric culture method), ví dụ BACTEC, SEPTICHEK, MGITs (nuôi cấy trong ống nghiệm có chỉ thị đo tăng trưởng của mycobacteria),

Phương pháp nuôi cấy đo bức xạ tự động như BACTEC sử dụng môi trường lỏng Middlebrook 7H12 có palmitic acid phát xạ do gắn carbon phóng xạ ^{14}C . Môi trường này cũng chứa một số yếu tố kháng khuẩn nhằm ngăn chặn các vi khuẩn không phải mycobacteria tăng trưởng. Kết quả của thử nghiệm này được chứng minh qua $^{14}\text{CO}_2$ có gắn phóng xạ được sản sinh ra trong quá trình tăng trưởng của mycobacteria. Sự tăng trưởng của mycobacteria thường được phát hiện trong vòng 9 - 16 ngày.

SEPTICHEK là một phương pháp nhanh khác dùng để phân lập mycobacteria. Đây là phương pháp không phóng xạ, dựa trên hệ thống môi trường lỏng lưỡng pha nhờ đó làm giảm thời gian phục hồi trung bình so với phương pháp truyền thống.

Một phương pháp mới được tiến hành đó là **MGITs**, biểu diễn sự tăng trưởng của vi sinh vật và cung cấp chỉ số định lượng tăng trưởng của *M. tuberculosis*. Trong thử nghiệm này sử dụng ống nghiệm đáy tròn có đầu dò cảm ứng (sensor) với oxygen đặt ở dưới ống.

46.12.10. Phương pháp phân tử

PCR và phương pháp khuếch đại nucleic acid khác thường được sử dụng để phát hiện trực tiếp *M. tuberculosis* trong các mẫu bệnh phẩm như CSF chẳng hạn. Thử nghiệm trực tiếp AMPLICOR *M. tuberculosis* là một ví dụ về thử nghiệm khuếch đại nucleic acid được sử dụng ở các nước phát triển như Hoa Kỳ chẳng hạn. Mục tiêu thử nghiệm AMPLICOR là trình tự chèn IS6110 trong DNA của trực khuẩn lao. Độ nhạy của thử nghiệm này dao động từ 40 % đến 60 % và độ đặc hiệu là 95 % ở các trường hợp lao dương tính. Thử nghiệm này cũng cho kết quả nhanh. Điểm bất lợi của thử nghiệm này đó là mẫu bệnh phẩm bị ô nhiễm các sản phẩm khuếch đại trước và sự hiện diện của các chất ức chế có thể làm gia tăng phản ứng âm tính giả hoặc dương tính giả.

Mẫu dò DNA: lai nucleic acid sử dụng mẫu dò DNA ngày càng tăng dùng để xác

định các loài *Mycobacterium*. Hiện nay nhiều mẫu dò thương mại có sẵn trên thị trường giúp xác định *M. tuberculosis* dễ dàng hơn. Mẫu dò DNA có độ nhạy và chuyên biệt là 100 %, khi có ít nhất 100.000 khuẩn lao hiện diện. Thử nghiệm này sử dụng mẫu dò DNA mạch đơn có gắn ester phát quang hóa học. Phát quang hóa học được xác định nhờ sử dụng quang kế (luminometer). Thử nghiệm mẫu dò DNA cho kết quả dương biểu thị cho mycobacteria là *M. tuberculosis*, *M. bovis*, hoặc *M. africanum*. Mẫu dò không thể phân biệt được các loài này. Nên cần sử dụng các thử nghiệm nhằm xác định khả năng sinh niacin, khử nitrate và sinh pyrazinamidase để phân biệt *M. tuberculosis* với *M. bovis* (Bảng 46.4).

46.13. Điều trị

Liệu pháp hóa học bằng cách sử dụng thuốc kháng lao đã được tối ưu hóa để điều trị bệnh lao. Liệu pháp kháng lao sẽ tiêu diệt trực khuẩn lao, vì thế ngăn chặn được các biến chứng sâu hơn của bệnh sơ cấp giai đoạn sớm và sự tiến triển của bệnh. Liệu pháp thuốc chống lao sẽ làm biến mất các tổn thương u hạt hay tổn thương dạng tổ ong (caseous lesion). Thuốc chống lao được phân thành hai dòng nhóm thuốc dòng thứ nhất và nhóm thuốc dòng thứ hai:

46.13.1. Thuốc trị lao dòng thứ nhất

Thuốc trị lao dòng thứ nhất gồm rifampicin, INH, ethambutol, streptomycin và pyrazinamide. Ngoại trừ ethambutol, tất cả các thuốc dòng thứ nhất này là chất diệt khuẩn. Các thuốc này ít độc tính và có hiệu năng cao so với các thuốc dòng thứ hai. Cả INH và rifampicin thì hiệu quả để chống lại trực khuẩn lao trong các ổ hoại tử và mycobacteria trong nội bào. Ngược lại streptomycin, aminoglycosides và capreomycin xâm nhập kém vào nội bào.

Điều trị bệnh lao cần có kết quả phát hiện trực khuẩn lao, cần kết hợp bốn thuốc INH, rifampicin, pyrazinamide và ethambutol. Theo đó uống kết hợp 4 loại thuốc này 3 lần /tuần trong hai tháng đầu, sau đó chỉ uống hai loại INH và rifampicin 3 lần/tuần trong thời gian 2 - 4 tháng. Vấn đề nổi lên hiện nay là đặc tính kháng thuốc tự nhiên của *M. tuberculosis* là vấn đề lớn trong liệu pháp hóa học điều trị bệnh lao. Điều này xảy ra là do sự đột biến với tần suất khoảng 10^6 tế bào phân chia.

Đa kháng thuốc: nếu các trường hợp bệnh lao được điều trị bằng một loại thuốc kháng lao, thì vi khuẩn lao nhạy cảm với thuốc đó sẽ bị tiêu diệt, ngược lại vi khuẩn không nhạy cảm với thuốc sẽ tiếp tục nhân lên. Chính vì vậy cần sử dụng nhiều kháng sinh kháng lao để tăng cường cường tính hiệu quả trong điều trị. Việc nổi lên lao kháng đa thuốc (MDR-TB) là vấn đề nghiêm trọng và khả năng vi khuẩn kháng được rifampicin và INH cùng với đó là kháng với một hoặc nhiều loại thuốc chống lao.

Điều này là do rifampicin và INH chủ yếu được sử dụng cho liệu pháp hóa học trong thời gian ngắn và các chủng *M. tuberculosis* trở nên kháng với cả loại thuốc này và vì vậy chúng không còn hiệu lực khi được chỉ định điều trị. Kháng đa thuốc (MDR) có hai dạng đó là sơ cấp và thứ cấp.

Kháng đa thuốc (MDR) sơ cấp được định nghĩa như là sự phát triển kháng đối với việc điều trị chống lao ở cá thể trước đây chưa có tiền sử điều trị bệnh lao. Kháng đa thuốc sơ cấp thường xảy ra:

- (a). Ở những bệnh nhân đang sống trong khu vực có mức độ phổ biến cao của *M. tuberculosis* kháng thuốc,
- (b). Ở những trường hợp phơi nhiễm với bệnh lao kháng thuốc và
- (c). Ở những trường hợp bị nhiễm HIV do sử dụng chung kim tiêm đưa ma túy vào tĩnh mạch.

Kháng đa thuốc (MDR) thứ cấp được định nghĩa như là sự nổi lên của tính kháng kháng lao (antitubercular resistance) trong thời gian nhiễm bệnh và điều trị kháng lao. Kháng đa thuốc thứ cấp thường phát triển:

- (a). Ở những bệnh nhân được điều trị không đủ liều và
- (b). Ở những người bệnh không uống thuốc kháng lao định kỳ.

Chế độ điều trị cho bệnh nhân lao kháng đa thuốc ban đầu được điều trị bằng bốn loại thuốc. Các loại thuốc này chứa ít nhất bốn loại tiêu diệt vi khuẩn như INH, rifampicin, pyrazinamide và hoặc là streptomycin hoặc là loại aminoglycoside khác hoặc ethambutol liều cao.

46.13.2. Thuốc kháng lao thế hệ thứ hai

Thuốc kháng lao thế hệ thứ hai được sử dụng cho các trường hợp bị bệnh lao khi

mà thuốc thể hệ thứ nhất không hiệu quả. Các loại kháng sinh gồm một lượng lớn thuốc cũ và mới như ciprofloxacin, cycloserine, ethionamide, kanamycin, ofloxacin, levofloxacin, capreomycin và các kháng sinh khác. Liệu pháp quan sát trực tiếp (DOT) là phương pháp hiện nay cho phép điều trị các trường hợp bệnh lao. DOT thì cực kỳ hữu ích để phòng ngừa nổi lên kháng kháng sinh bằng cách đảm bảo sử dụng phù hợp kháng sinh cho bệnh nhân.

46.14. Ngăn ngừa và kiểm soát

Bao gồm phòng ngừa bằng hóa học (chemoprophylaxis), sử dụng vaccine và biện pháp sức khỏe tổng thể.

46.14.1. Phòng ngừa bằng hóa học

Phòng ngừa bằng hóa học hay liệu pháp hóa học để phòng ngừa được tiến hành bằng cách sử dụng thuốc chống lao như INH. INH thường được sử dụng để điều trị:

- (1). Những người bị bệnh lao âm ỉ,
- (2). Người bị nhiễm HIV,
- (3). Tiếp xúc với bệnh nhân lao lây nhiễm trong vòng 3 tháng, ngay cả khi TST cho kết quả âm tính,
- (4). Trẻ chưa tiêm vaccine và
- (5). Người già bị bệnh âm ỉ được chứng minh bằng kết quả X quang.

Các trường hợp này đã được điều trị bằng INH, liều sử dụng 5 mg/kg ngày trong 6 - 12 tháng. Kết quả nghiên cứu cho thấy liệu pháp phòng bệnh hóa học bằng INH được xem là giảm nguy cơ mắc phải bệnh gần 90%.

46.14.2. Tiêm vaccin

Tiêm vaccin chống lại bệnh lao được tiến hành bằng cách sử dụng vaccine. BCG là vaccine được điều chế từ chủng vi khuẩn *M. bovis* còn sống đã được làm yếu. Chủng vi khuẩn được làm yếu này được Calmette và Guérin điều chế đầu tiên vào năm 1921.

Cứ ba tuần, họ đã cấy chuyển chủng vi khuẩn này để sau đó thành 230 chủng cấy chuyển trên môi trường khoai tây ngâm trong mật bò vô trùng có chứa glycerol 5% trong suốt 13 năm. Vaccine BCG ở dạng lỏng hoặc dạng đông khô. Dạng đông khô thường được sử dụng, khi sử dụng vaccine đông khô cần hoàn nguyên bằng nước muối sinh lý vô

trùng đạt thể tích cuối là 0,1 mL trước khi sử dụng.

Vaccine đã được hoàn nguyên có tuổi đời 3 - 6 giờ. Khi sử dụng, tiêm 0,1 ml vaccine đã được hoàn nguyên vào dưới da. Ở thử nghiệm dương, một nốt nhỏ phát triển tại vị trí tiêm sau 2 - 3 tuần tiêm. Nốt này tăng kích thước từ và sau khoảng 5 tuần đạt đường kính 4 - 8 mm. Sau đó lún xuống hoặc vỡ ra thành vết lõ nông, rồi lành miệng có sẹo.

Sau khi tiêm vaccin BCG, cá thể âm tính với tuberculin được chuyển đổi thành phản ứng dương. Sự miễn dịch sau khi tiêm vaccin BCG thì tương tự và có thể kéo dài khoảng 15 năm.

Mặc dù vaccin BCG đã được sử dụng từ năm 1921 và khoảng 3 tỉ liều đã được sử dụng, hiệu quả của vaccine này vẫn còn tranh cãi. Một số thử nghiệm trong lĩnh vực này đã được tiến hành để đánh giá hiệu năng của vaccine. Kết quả thu được có sự dao động lớn từ 0 đến 80% được bảo vệ. Tuy nhiên ở hai cuộc thử nghiệm phân tích quy mô lớn bao gồm thử nghiệm được tiến hành ở Ấn Độ cho thấy vaccine BCG thì hiệu quả chống lại bệnh lao kê và lao màng não.

Lưu ý về vaccine:

(1). BCG là vaccine được sử dụng rộng rãi để ngăn chặn viêm màng não lao và bệnh lao phát tán, đây là hai bệnh nghiêm trọng và đe dọa mạng sống ở trẻ.

(2). Vaccine BCG không ngăn chặn được sự nhiễm khuẩn do *M. tuberculosis*.

(3). Có sự tranh cãi về hiệu năng của vaccine BCG chống lại bệnh phổi.

(4). Vaccine BCG cấm dùng cho những bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch như (a) bị HIV, (b) khiếm khuyết miễn dịch sơ cấp và thứ cấp và (c) ở những bệnh nhân đang điều trị bằng steroid. Các biến chứng khi sử dụng vaccine BCG gồm hình thành áp se dưới da và phát triển chứng hạch bạch huyết (lymphadenopathy) tại vị trí tiêm. Các biến chứng có thể phải được điều trị bằng thuốc kháng lao ngoại trừ pyrazinamide.

(5). Hiện nay vaccine này đang được sử dụng ở hơn 100 quốc gia và được dùng cho trẻ sơ sinh ngay khi sinh. WHO khuyến cáo nên sử dụng vaccine ở trẻ bị nhiễm HIV nhưng không biểu hiện triệu chứng ở những nơi mà nguy cơ cao về bệnh lao.

46.14.3. Biện pháp sức khỏe tổng thể

Biện pháp sức khỏe tổng thể gồm dinh dưỡng đầy đủ, nơi ở tốt và giáo dục về gìn giữ và bảo vệ sức khỏe cá nhân và cộng đồng.