

Chương 51. *Salmonella*

Mục lục

Chương 51. <i>Salmonella</i>	1
51.1. Giới thiệu	3
51.2. Đặc điểm vi khuẩn	4
51.2.1. Hình thái	4
51.2.2. Nuôi cấy	4
51.2.3. Đặc điểm sinh hoá	7
51.2.4. Các đặc điểm khác.....	9
51.2.5. Thành phần thành tế bào và cấu trúc kháng nguyên	9
51.3. Đặc điểm gây bệnh	14
51.3.1. Yếu tố độc	14
51.3.2. Phát sinh bệnh thương hàn	16
51.4. Dịch tễ học	20
51.4.1. Phân bố	20
51.4.2. Môi trường sống	20
51.4.3. Nguồn truyền nhiễm.....	20
51.5. Phân loại và phân kiểu <i>Salmonella</i>	22
51.5.1. Phân loại theo hệ thống Kauffmann - White.....	22
51.5.2. Phân kiểu thực khuẩn thể	23
51.5.3. Phân kiểu sinh học	24
51.5.4. Phương pháp phân tử:	24

51.6.	Phát hiện tại phòng thí nghiệm.....	25
51.6.1.	Mẫu vật.....	25
51.6.2.	Nuôi cấy	25
51.6.3.	Xác định vi khuẩn	34
51.6.3.3.	Huyết thanh.....	35
51.6.4.	Phương pháp phân tử	38
51.7.	Điều trị.....	39
51.8.	Phòng ngừa và kiểm soát.....	40
51.8.1.	Phòng ngừa tổng thể.....	40
51.8.2.	Tiêm chủng.....	40

51.1. Giới thiệu

Salmonella là vi khuẩn Gram âm, hình que, kỵ khí tùy nghi thuộc họ *Enterobacteriaceae*, thông thường trực khuẩn này được biết như là vi khuẩn đường ruột. Giống như *E. coli*, *Salmonella* gần như được nghiên cứu rất kỹ từ cấu trúc, sinh hóa và phân tử nhưng sinh thái học của chúng lại chưa được hiểu rõ. *Salmonella* thường sống trong các động vật máu nóng và máu lạnh. Một số loài phân bố rộng khắp. Các loài khác chỉ có trong động vật chủ.

Salmonella là vi khuẩn gây bệnh thường gặp ở người và động vật. Khuẩn này gần như xâm nhiễm và kết cụm trong tất cả động vật gồm gia súc, gia cầm, chim, rùa, thạch sùng, ... động vật nuôi khác và trong cả con người chúng ta. Bệnh do *Salmonella* ở người chủ yếu gồm ba hội chứng lâm sàng chính đó là viêm dạ dày ruột, sốt thương hàn hoặc bệnh khu trú ở ổ. Ở người, *Salmonella* gây hai bệnh gồm: (1) sốt thương hàn là do vi khuẩn xâm nhiễm vào máu, gây bệnh viêm dạ dày ruột cấp tính và (2) gây ngộ độc thực phẩm. Bệnh ở người do *Salmonella* spp. được tóm tắt tại Bảng 51.1.

Khuẩn này có đặc trưng do sự hiện diện của các kháng nguyên O, H và Vi. Việc phân loại giống *Salmonella* thì phức tạp và rắc rối, có những điểm đáng chú ý như sau:

(1). Dựa trên tính tương đồng DNA và động vật chủ, giống *Salmonella* được phân thành hai loài: (i) *Salmonella* Enterica và (ii) *Salmonella* Bongori. *S. Enterica* được phân sâu hơn nữa thành sáu loài phụ là I, II, IIa, IIb, IV và VI.

(2). Hầu hết salmonella gây bệnh ở người thuộc nhóm phụ I của *S. Enterica* subsp. *enterica*. Nhóm phụ này gồm salmonella gây bệnh thương hàn, salmonella gây bệnh phó thương hàn và hầu hết các kiểu huyết thanh khác gây bệnh cho động vật có vú.

(3). Hơn nữa mỗi chủng phân lập *Salmonella* được phân kiểu huyết thanh dựa trên kháng nguyên thân O, kháng nguyên tiên mao H và kháng nguyên bề mặt Vi. Theo đó hiện tại có hơn 2.400 kiểu huyết thanh đã được mô tả.

(4). Do kiểu huyết thanh của salmonella là duy nhất nên mỗi kiểu huyết thanh của chúng được xem là một loài. Các kiểu huyết thanh salmonella được đặt tên như sau, ví dụ *S. Enterica* subsp. *enterica* có kiểu huyết thanh là Enteritidis. Tuy nhiên để thuận tiện trong tên gọi, khuẩn này được viết tắt thành *S. Enteritidis* hoặc chỉ gọi là Enteritidis cho các

trường hợp lâm sàng. Hơn nữa kiểu huyết thanh thường không in nghiêng nhưng viết bằng tiếng La Mã.

Bảng 51.1. Bệnh ở người do *Salmonella* spp.

Vi khuẩn	Bệnh
<i>Salmonella</i> Typhi	Sốt thương hàn, nhiễm trùng máu do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Paratyphi A, B và C	Sốt phó thương hàn, nhiễm trùng máu do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	Nhiễm trùng máu do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Viêm dạ dày ruột do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Viêm dạ dày ruột do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Hadar	Viêm dạ dày ruột do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Viêm dạ dày ruột do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Agona	Viêm dạ dày ruột do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Virchow	Viêm dạ dày ruột do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Seftenberg	Viêm dạ dày ruột do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Indiana	Viêm dạ dày ruột do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Newport	Viêm dạ dày ruột do <i>Salmonella</i>
<i>Salmonella</i> Anatum	Viêm dạ dày ruột do <i>Salmonella</i>

51.2. Đặc điểm sinh học

51.2.1. Hình thái

Salmonella là trực khuẩn Gram âm, hình que, kích thước 1 - 3 μm . Khuẩn này di động nhờ tiên mao xung quanh tế bào ngoại trừ *Salmonella* Gallinarum và *Salmonella* Pullorum không có tiên mao. *Salmonella* không hình thành bào tử và capsule. Một số chủng tạo thể tua nhưng hầu hết các chủng của *Salmonella* Paratyphi A và một số chủng *Salmonella* Paratyphi B, *Salmonella* Typhi và *Salmonella* Typhimurium không có thể tua.

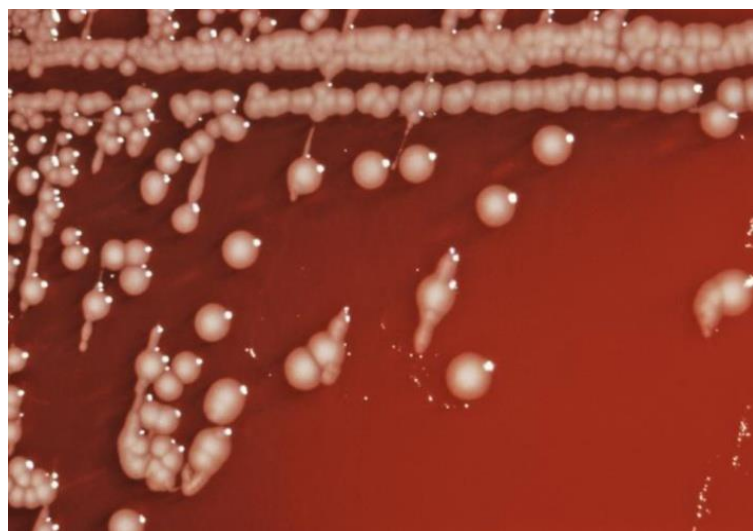
51.2.2. Nuôi cấy

Salmonella là vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí tùy nghi (có hoặc không có oxygen); chúng tăng trưởng tối thích ở nhiệt độ 37°C trong khoảng pH từ 6 - 8 trên nhiều môi trường không chọn lọc và chọn lọc.



Hình 51.1. Vi khuẩn *Salmonella* Typhi. (a) ảnh nhuộm Gram *Salmonella typhi*, (b) ảnh *Salmonella* Typhi được tạo ra từ hình chụp dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM), thể hiện rõ thể tua và tiên mao của vi khuẩn (CDC).

(1). Môi trường không chọn lọc: trên môi trường thạch dinh dưỡng và thạch máu: sau 18 - 24 giờ ủ, *Salmonella* spp. hình thành khuẩn lạc màu trắng xám, ẩm ướt, bề mặt lồi, nhẵn. Các chủng ráp tạo khuẩn lạc nhỏ có màu đục mờ và bề mặt không đều. Một số chủng *S. Paratyphi* B hình thành khuẩn lạc nhầy do sản sinh polysaccharide dạng nhớt. Trên môi trường thạch MacConkey, chúng hình thành khuẩn lạc không màu do không lên men được lactose. *S. Typhi* không tăng trưởng được trên môi trường này. Các khuẩn lạc



của *Salmonella* trên môi trường thạch deoxycholate citrate thì tương tự như khuẩn lạc hình thành trên môi trường thạch MacConkey. Sau khi ủ hoặc ủ kéo dài, đôi khi xuất hiện các khuẩn lạc tâm đen.

Hình 51.2. Hình dạng khuẩn lạc *Salmonella* trên môi trường

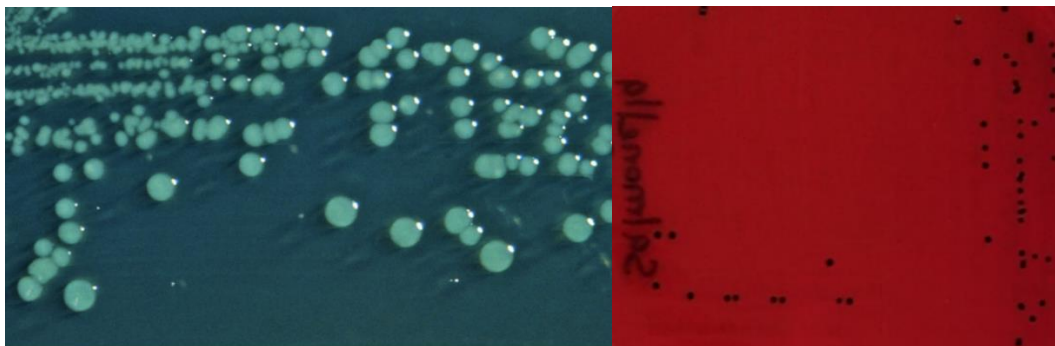
thạch máu có màu trắng, ẩm ướt, lồi (CDC).

(2). Môi trường chọn lọc:

(a). Trên môi trường thạch Hektoen enteric (HE): *Salmonella* hình thành khuẩn lạc màu xanh dương - xanh lá cây có hoặc không có tâm đen. Nhiều chủng *Salmonella* có

thể hình thành khuẩn lạc lớn, tâm đen ánh hay có thể hình thành khuẩn lạc gần như đen hoàn toàn.

(b). Trên môi trường thạch Xylose lysine desoxycholate (XLD): *Salmonella* hình thành khuẩn lạc màu hồng có tâm đen hoặc không. Nhiều chủng *Salmonella* có thể hình thành khuẩn lạc màu hồng lớn, tâm đen ánh hay có thể hình thành khuẩn lạc gần như đen hoàn toàn do sản sinh H_2S .



Hình 51.3. Khuẩn lạc salmonella trên môi trường Hektoen enteric (trái) và trên môi trường thạch Xylose lysine desoxycholate.

(c). Trên môi trường thạch Bismuth sulfite (BS): *Salmonella* hình thành khuẩn lạc màu nâu, xám hoặc đen; đôi khi các khuẩn lạc có ánh kim. Trước tiên xung quanh môi trường thường là màu nâu nhưng có thể trở lại màu đen khi ủ kéo dài, hình thành cái gọi là hiệu ứng halo.

(3). Khuẩn lạc không điển hình

(a). Trên môi trường thạch HE và XLD: một số chủng nuôi cấy *Salmonella* không điển hình hình thành khuẩn lạc màu vàng có hoặc không có tâm đen trên môi trường thạch HE và XLD. Không có các khuẩn lạc điển hình của *Salmonella* trên môi trường thạch HE và XLD sau 24 ± 2 giờ ủ.

(b). Trên môi trường thạch BS: một số chủng hình thành khuẩn lạc màu xanh có một ít hoặc không có sự thâm đen của môi trường xung quanh.

(4). Môi trường lỏng: dung dịch đậm peptone dùng để tăng sinh, các môi trường lỏng chọn lọc khác như Tetrathionate mặc dù được sử dụng để chọn lọc cho salmonella nhưng các vi khuẩn *Shigella* spp. và *Proteus* spp. vẫn tăng trưởng được. Môi trường lỏng Tetrathionate có brilliant green, mặc dù ức chế *Proteus* spp. tăng trưởng nhưng đôi khi lại

ức chế cả *Salmonella* spp. Môi trường lỏng chọn lọc Rappaport - Vassiliadis soy peptone là môi trường thường được sử dụng để tăng sinh chọn lọc *Salmonella* ở 42°C trong 18 - 24 giờ.

51.2.3. Đặc điểm sinh hoá

Salmonella biểu hiện các đặc điểm sinh hoá sau:

(1). Khuẩn này lên men được glucose, mannitol và maltose để hình thành acid và hơi. Ngoại trừ *S. Typhi* không lên men được các đường này.

(2). *Salmonella* không lên men lactose, sucrose hay salicin.

(3). *Salmonella* không hình thành indole.

(4). Hầu hết *Salmonella* đều sinh H₂S, ngoại trừ *S. Paratyphi* A, *S. Choleraesuis* và một số loài khác.

(5). *Salmonella* không có khả năng thủy giải urea. Khuẩn này có phản ứng MR dương, VP âm và citrate dương. Tuy nhiên *S. Typhi* và *S. Paratyphi* không tăng trưởng được trên môi trường Simmon's citrate và khi đó chúng sử dụng tryptophan làm yếu tố cần thiết cho sự tăng trưởng.

Bảng 51.2. Đặc điểm sinh hóa của *Salmonella*.

Thử nghiệm/Cơ chất	Kết quả		Phản ứng của <i>salmonella</i>
	Dương	Âm	
Glucose trên TSI	Phần đứng màu vàng	Phần đứng màu đỏ	+
Lysine decarboxylase (LIA)	Phần đứng màu tía	Phần đứng màu vàng	+
H ₂ S (từ TSI & LIA)	Làm đen	Không làm đen	+
Urease	Màu đỏ - tía	Không đổi màu	—
Lysine decarboxylase	Màu tía	Màu vàng	+
Phenol red dulcitol	Màu vàng và/hoặc sinh hơi	Không hơi, không đổi màu	+(b)
KCN	Tăng trưởng	Không tăng trưởng	—
Malonate	Màu xanh dương	Không đổi màu	—(c)
Indole	Màu đỏ ở bề mặt	Màu vàng ở bề mặt	—

Polyvalent H	Ngưng kết	Không nhưng kết	+
Polyvalent O	Ngưng kết	Không nhưng kết	+
Phenol red lactose	Màu vàng và/hoặc sinh hơi	Không sinh hơi; không đổi màu	— ^(c)
Phenol red sucrose	Màu vàng và/hoặc sinh hơi	Không sinh hơi; không đổi màu	—
Voges - Proskauer	Màu hồng đến đỏ	Không đổi màu	—
Methyl red	Màu đỏ phân tán	Màu vàng phân tán	+
Simmons citrate	Tăng trưởng; màu xanh dương	Không tăng trưởng, không đổi màu	V

^a +: 90% dương hoặc nhiều hơn trong thời gian 1 hoặc 2 ngày; —: 90% âm tính hoặc nhiều hơn trong thời gian 1 hoặc 2 ngày; v: dao động. ^b Phần lớn *S. arizonae* cho kết quả âm. ^c Phần lớn *S. arizonae* cho kết quả dương. Nguồn: BAM, FDA.

(6). Salmonella có khả năng khử carboxyl của lysine, ornithine và arginine nhưng không khử được carboxyl của glutamic acid. Tuy nhiên *S. Typhi* không khử được nhóm carboxyl của ornithine và *S. Paratyphi A* không khử carboxyl của lysine.

(7). Salmonella có phản ứng catalase dương và oxidase âm.

Đặc điểm sinh hoá để phân biệt các loài *Salmonella* spp. được tóm tắt tại Bảng 51.2 và 51.3.

Bảng 51.3. Phản ứng sinh hoá của một số loài *Salmonella* gây bệnh ở người.

Phản ứng	Các loài <i>Salmonella</i>			
	<i>S. Typhi</i>	<i>S. Paratyphi A</i>	<i>S. Paratyphi B</i>	<i>S. Paratyphi C</i>
Glucose	A	A & H	A & H	A & H
Mannitol	A	A & H	A & H	A & H
Lactose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-
Citrate	-	-	+	+
MR	+	+	+	+

VP	-	-	-	-
H₂S	+	-	+	+
Xylose	C	-	A & H	A & H
D-Tartrate	A	-	-	A & H
Mucate	C	-	A & H	-

Ghi chú: A: chỉ sinh acid; A & H: sinh acid và hơi; C: phản ứng chậm.

51.2.4. Các đặc điểm khác

Salmonella tăng trưởng tốt trong khoảng nhiệt độ từ 4,2⁰C đến 46,2⁰C, trong khoảng pH từ 3,7 đến 9,5 và thế nước (a_w) thấp nhất 0,94. Salmonella dễ dàng bị tiêu diệt ở nhiệt độ 55⁰C trong 1 giờ hoặc ở 60⁰C trong 15 phút. Chúng cũng bị tiêu diệt trong dung dịch mercuric chloride 0,2% hay dung dịch phenol 5% trong 5 phút. Nhiệt độ sôi, dung dịch chlorine và thanh trùng pasteur sẽ tiêu diệt vi khuẩn này. Salmonella tồn tại vài tuần trong nước ô nhiễm và đất, nhiều tháng trong nước đá. Chúng nuôi cấy có thể sống trong nhiều năm nếu ngăn chặn làm khô tế bào vi khuẩn.

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

51.2.5.1. Lipopolysaccharide (LPS)

Giống như thành tế bào của vi khuẩn Gram âm khác, thành tế bào của salmonella chứa phức hợp cấu trúc lipopolysaccharide (LPS). LPS được phóng thích khi tế bào bị phân giải và một lượng nhỏ phức hợp này cũng được phóng thích trong quá trình tế bào tăng trưởng. Chức năng LPS đóng vai trò như là nội độc tố và thành phần gây độc quan trọng của vi khuẩn. Phức hợp LPS gồm ba phần: (1) chuỗi polysaccharide O ngoài, (2) phần giữa (lõi R) và (3) chuỗi lipid A bên trong. LPS của salmonella là thành phần quan trọng vì những lý do sau:

(1). Các đơn vị đường lặp lại trong chuỗi polysaccharide O chuyên biệt cho kháng nguyên O. Điều này cũng giúp xác định độc lực của vi khuẩn. Các chủng *Salmonella* thiếu trình tự hoàn chỉnh của các đơn vị đường O lặp lại chính là các chủng ráp (xù xì). Chúng được gọi như vậy là vì hình dạng khuẩn lạc ráp. Các chủng ráp này ít độc hay không độc so với các chủng nhẵn là các chủng có đầy đủ trình tự các đơn vị đường O lặp lại.

(2). Thành phần nội độc tố của thành tế bào thì quan trọng trong phát sinh bệnh do

Salmonella. Nội độc tố gây sốt, giảm chức năng của cơ. Nội độc tố tuần hoàn cũng có vai trò trong việc góp phần phát triển triệu chứng sốc do nhiễm trùng máu có thể làm xuất hiện bệnh toàn thân.

(3). Kháng thể được tạo ra chống lại lõi R thì được bảo vệ chống lại sự xâm nhiễm do nhiều vi khuẩn Gram âm có cùng cấu trúc lõi (là kháng nguyên chung của vi khuẩn đường ruột).

51.2.5.2. Đặc tính kháng nguyên

Salmonella có ba kháng nguyên chính: (1). Kháng nguyên H hay còn gọi là kháng nguyên tiên mao (2). Kháng nguyên O hay kháng nguyên thân (3). Các kháng nguyên bề mặt.

(1). Kháng nguyên H: là kháng nguyên hiện diện trên tiên mao, không bền nhiệt và không bền trong alcohol. Kháng nguyên này bị phá huỷ khi đun sôi hoặc xử lý bằng alcohol và acid, nhưng lại lưu giữ được hoạt tính khi xử lý bằng formaldehyde có nồng độ từ 0,2 - 0,4%. Kháng nguyên H của *Salmonella* thì đặc trưng cho giống và khác với các vi khuẩn đường ruột khác. Kháng nguyên H là chất gây miễn dịch mạnh và liên quan đến sự hình thành kháng thể sau khi nhiễm hoặc tạo miễn dịch. Kháng nguyên H có thể xuất hiện ở một hoặc cả hai dạng gọi là phase I và phase II. Vi khuẩn có khuynh hướng thay đổi từ một phase này sang phase khác. Việc định danh kiểu huyết thanh phụ thuộc vào việc phát hiện cấu trúc huyết thanh trong cả hai phase.

(2). Kháng nguyên O hay kháng nguyên thân: kháng nguyên O xuất hiện trên bề mặt màng ngoài của vi khuẩn và được xác định nhờ trình tự đường đặc trưng trên bề mặt tế bào. Kháng nguyên O là một phức hợp LPS và một phần xen vào của thành tế bào. Kháng nguyên này bền nhiệt, kháng được nhiệt độ sôi trong 2 giờ và ở nhiệt độ lớn hơn nhiệt độ sôi trong 30 phút. LPS cũng bền với alcohol, kháng được ethanol 96% ở 37°C trong 4 giờ và cũng kháng được formaldehyde 0,2%. Kháng nguyên thân được chiết xuất từ thành tế bào bằng cách xử lý với trichloroacetic acid. Khi xử lý bằng phenol sẽ loại bỏ được tính kháng nguyên nhưng vẫn giữ được độc lực của vi khuẩn. Kháng nguyên O ít sinh miễn dịch hơn so với kháng nguyên H. Nhìn chung lượng kháng thể O được sản sinh ra sau khi nhiễm hoặc tạo miễn dịch thì thấp hơn so với kháng thể H. Kháng nguyên O không

phải là yếu tố đơn lẻ mà là gắn ghép của hai hoặc nhiều hơn hai các yếu tố kháng nguyên. *Salmonella* được phân loại dựa trên sự hiện diện của kháng nguyên đặc trưng có trên bề mặt vi khuẩn. Cho đến nay có 67 kháng nguyên O đã được mô tả. Dựa trên kháng nguyên thân này, *Salmonella* được phân thành 46 nhóm huyết thanh O.

(3). Kháng nguyên bề mặt: kháng nguyên bề mặt gồm (a). Kháng nguyên Vi, (b). Kháng nguyên M và N, và (c). Kháng nguyên F. Các kháng nguyên này có những đặc điểm như sau:

(a). Kháng nguyên Vi: được Felix và Pitt mô tả đầu tiên, là một kháng nguyên bề mặt chồng lẫn lên kháng nguyên O. Felix và Pitt cho rằng kháng nguyên này có liên quan đến tính độc và đặt tên là kháng nguyên Vi. Kháng nguyên Vi tương tự như kháng nguyên K của coliform. Kháng nguyên Vi chỉ hiện diện trong một số kiểu huyết thanh, quan trọng nhất là ở *S. Typhi*. Kháng nguyên này cũng hiện diện trong một số chủng *Salmonella* Paratyphi C, *Salmonella* Dublin và *Citrobacter freundii*. Sự hiện diện của kháng nguyên Vi trên bề mặt làm cho các vi khuẩn này có khả năng ngưng kết với kháng huyết thanh đặc trưng của chúng nhưng đồng thời cũng có khả năng ngưng kết với kháng huyết thanh Vi. Kháng nguyên Vi thì không bền nhiệt và bị phá hủy ở nhiệt độ sôi trong vòng 1 giờ. Chúng cũng không bền khi được xử lý bằng phenol hydrochloric acid và 0,5 sodium hydroxide, nhưng lại không bị ảnh hưởng khi xử lý bằng dung dịch formaldehyde 0,25% hay alcohol. Kháng nguyên Vi bị mất sau nhiều lần cấy chuyển. Kháng nguyên này có những đặc điểm sau:

(i). Sinh miễn dịch kém và có liên quan đến lượng kháng thể thấp trong quá trình xâm nhiễm.

(ii). Kháng thể không xuất hiện sớm trong giai đoạn phục hồi. Sự dai dẳng của chúng biểu thị cho trạng thái mang khuẩn.

(iii). Trong trường hợp chứng minh bệnh sốt thương hàn, không thấy có mặt kháng thể Vi cho thấy tiên lượng bệnh kém.

(iv). Vaccine qua xử lý phenol thì không cảm ứng kháng thể Vi hình thành trong huyết thanh, nhưng vaccine qua xử lý cồn thì cảm ứng một lượng thấp kháng thể Vi.

(v). Việc chứng minh kháng thể Vi không hữu dụng trong chẩn đoán các trường hợp

bị bệnh thương hàn. Vì vậy kháng nguyên này không được thử nghiệm trong phép thử Widal.

(b). Kháng nguyên M và kháng nguyên N: đây là những kháng nguyên polysaccharide hiện diện trên bề mặt của vi khuẩn. Những kháng nguyên này ngăn chặn sự ngưng kết do kháng huyết thanh O. Các kháng nguyên này sẽ bị phá hủy ở nhiệt độ sôi trong 2,5 giờ. Sự hiện diện của kháng nguyên M làm cho khuẩn lạc của *Salmonella* trở nên nhầy.

(c). Kháng nguyên F: kháng nguyên này hiện diện trên thể tua. Chúng xuất hiện trong hai phase: một có kháng nguyên F và phase kia không có kháng nguyên F.

(4). Sự đa dạng về tính kháng nguyên

Các kháng nguyên Salmonella đa dạng về kiểu hình và kiểu gen như sau: (a). Đa dạng về OH - O; (b). Đa dạng về V - W; (c). Đa dạng về S - R; (d). Đa dạng về phase và (e). Đa dạng về kháng nguyên O.

(a). Đa dạng về OH - O: đôi khi salmonella có tiên mao (OH) lại biến thành các chủng không có tiên mao (O). Sự dao động này được gọi là dao động OH - O là do liên quan đến mất tiên mao. Khi salmonella tăng trưởng trên môi trường thạch có phenol với tỷ lệ 1:800, thì vi khuẩn sẽ không tạo tiên mao. Phenol sẽ làm thay đổi kiểu hình và sự thay đổi này có tính tạm thời bởi vì tiên mao sẽ tái xuất hiện khi các chủng này được cấy chuyển sang môi trường không có phenol. Việc mất hoàn toàn tiên mao thường không xảy ra nhưng chỉ làm giảm số lượng tiên mao và vì vậy dẫn đến giảm lượng kháng nguyên H. Một lượng nhỏ vi khuẩn có tiên mao cũng được phát hiện trong các chủng nuôi cấy này. Cấy chuyển sang môi trường Craigie thường được sử dụng để thu nhận quần thể vi khuẩn có tiên mao từ các chủng nuôi cấy này.

(b). Đa dạng về V - W: hầu hết các chủng S. Typhi mới phân lập đều mang bề mặt kháng nguyên Vi làm che đầy hoàn toàn kháng nguyên O. Khi đó kháng nguyên Vi biểu hiện đầy đủ, làm cho trực khuẩn ngưng kết với kháng huyết thanh Vi nhưng lại không ngưng kết với kháng huyết thanh O nên được gọi là dạng V. Tuy nhiên sau một số lần cấy chuyển, kháng nguyên Vi sẽ hoàn toàn bị mất và các chủng này không ngưng kết với kháng nguyên Vi nhưng lại ngưng kết với kháng nguyên O. Đây được gọi là dạng W. Khi mất

một phần kháng nguyên Vi, vi khuẩn sẽ ngưng kết với cả kháng huyết thanh Vi và O; khi đó được gọi là dạng VW. Tuy nhiên ở trường hợp *S. Paratyphi C* và *S. Dublin*, kháng nguyên Vi không hoàn toàn che khuất được kháng nguyên O.

(c). Sự biến đổi S - R: sự biến đổi từ dạng nhẵn sang dạng ráp (S - R) xảy ra là do sự đột biến và có liên quan đến: (i) thay đổi hình dạng khuẩn lạc từ nhẵn sang ráp, (ii) mất kháng nguyên O và (iii) mất độc tính. Khuẩn lạc ráp trở nên lớn hơn, có hình dạng xù xì và không đều cùng với đó là vi khuẩn không thể tự ngưng kết trong nước muối. Các khuẩn lạc này bị khiếm khuyết về biểu hiện kháng nguyên O. Sự biến đổi thành dạng ráp hiếm khi xảy ra trong tự nhiên nhưng thường xuất hiện ở các chủng trong phòng thí nghiệm được lưu giữ trong môi trường thông thường qua nhiều lần cấy chuyển. Sự biến đổi nhẵn S sang ráp R có thể được ngăn chặn bằng cách giữ chủng trên môi trường trứng Dorset hay lưu giữ bằng kỹ thuật đông khô.

(d). Đa dạng về phase: kháng nguyên tiên mao hay kháng nguyên H của hầu hết salmonella xuất hiện ở hai phase khác nhau: phase 1 và phase 2. Kháng nguyên phase 1 hoặc chuyên biệt cho một kiểu huyết thanh hoặc chỉ cho một loài mới, theo đó được gọi là phase chuyên biệt hay phase cho loài. Có hơn 80 kháng nguyên tiên mao được phát hiện trong phase này. Các kháng nguyên này được ký hiệu bằng các ký chữ cái alphabet thường theo thứ tự từ a - z (ngoại trừ j), và kế đến là z1 - z68. Việc xác định kiểu huyết thanh giả định được dựa trên việc xác định kháng nguyên trong phase 1. Kháng nguyên phase 2 được phát hiện rộng rãi, nên được gọi là phase không chuyên biệt hoặc phase có tính chất nhóm. Các kháng nguyên phase 2 thì ít hơn và được ấn định bằng số Ả Rập từ 1 đến 12.

Các chủng *Salmonella* xuất hiện trong cả hai phase được gọi là lưỡng phase, ngược lại các chủng chỉ xuất hiện một phase được gọi là đơn phase ví dụ *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* Một chủng có thể có kháng nguyên H có cả hai phase nhưng thông thường chỉ có một hoặc phase khác chiếm ưu thế vì vậy chủng nuôi cấy đó chỉ ngưng kết với một phase kháng huyết thanh. Để xác định các chủng phân lập *Salmonella* bằng kiểu huyết thanh, thì cần thiết xác định kháng nguyên H của cả hai phase. Sự biến đổi các chủng phân lập từ một phase này sang phase khác đạt được bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy trong ống Craigie. Trong phương pháp này, chủng nuôi cấy ở phase 1 được biến đổi thành phase 2

bằng cách chuyển qua ống nghiệm Craigie có chứa kháng huyết thanh chuyên biệt cho phase 1 và biến đổi ngược lại đạt được bằng cách sử dụng kháng huyết thanh pha 2.

51.3. Đặc điểm gây bệnh

S. Typhi là vi khuẩn xâm lấn. Khuẩn này kết cụm trong ruột người và dưới những điều kiện cụ thể, trực tiếp xâm lấn vào niêm mạc ruột hoặc nhân lên trong các tế bào thực bào đơn nhân của gan, lách, hạch bạch huyết và mảng Peyer của hồi tràng một vài ngày trước khi xâm lấn. Sau đó *S. Typhi* xâm nhập vào máu và tạo ra các biểu hiện bệnh.

51.3.1. Yếu tố độc

Nhiều yếu tố gây độc đã được chứng minh đóng nhiều vai trò trong phát sinh bệnh của *Salmonella*. Các yếu tố này gồm tiêm mao, capsule, plasmid, các yếu tố dính và hệ tiết kiểu 3 (T3SS). Các yếu tố gây độc này được các vùng gen gây bệnh (SPI)-1, SPI-2 và các vùng gen gây bệnh khác mã hóa. Giống như nhiều vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác, *Salmonella enterica* sản sinh ra nhiều yếu tố quyết định độc tính (virulence determinant), một trong số đó là thống dính gồm yếu tố dính, yếu tố xâm lấn, thể tua, yếu tố ngưng kết hồng cầu (hemagglutinin), ngoại độc tố (exotoxin) và nội độc tố (endotoxin). Các yếu tố này hoạt động đơn lẻ hoặc kết hợp với các yếu tố khác cho phép *Salmonella* kết cụm vào tế bào chủ thông qua bám dính, xâm lấn, sống sót và tránh được cơ chế phòng vệ của tế bào chủ như tính acid của dạ dày chẳng hạn, enzyme protease của dạ dày ruột, và sự phòng vệ cũng như yếu tố gây hấn (aggressin) của hệ vi sinh vật đường ruột.

Các vùng gen gây bệnh của *Salmonella* (SPIs) là các cụm gen nằm trên một số vùng của nhiễm sắc thể vi khuẩn có nhiệm vụ mã hóa cho nhiều yếu tố độc gây độc gồm các gen dính, gen xâm lấn, gen độc tố, Các cụm gen này hay các vùng gen gây bệnh (SPIs) có thể nằm trên hoặc plasmid hoặc trên nhiễm sắc thể; SPIs có thành phần G/C dao động và có các tự lặp lại khi được so sánh với vùng gen lân cận. SPIs có đặc điểm thường liên quan đến RNA vận chuyển (tRNA) và các yếu tố di động như gen nhảy (transposon) hoặc gen có nguồn gốc từ phage (phage gene).

Các yếu tố gây độc của *Salmonella* thì phức tạp. Các gen mã hóa nằm trên cả nhiễm sắc thể và trên các plasmid lớn có kích thước từ 34 - 120 kDa vi khuẩn. Yếu tố gây độc của *Salmonella* spp được tóm tắt tại Bảng 51.4.

51.3.1.1. Hệ các chất tiết kiểu III (TTSS)

Hệ các chất tiết kiểu III (TTSS) này gồm khoảng 20 protein, tạo thuận lợi để *Salmonella* tiết ra các yếu tố gây độc vào tế bào chủ. Các protein này được một số vùng gen gây bệnh (pathogenicity island) của *Salmonella* mã hóa như vùng gen *Salmonella* gây bệnh 1 (SPI-1), vùng gen *Salmonella* gây bệnh 2 (SPI-2) và *phoP/phoQ*. Khi không có những vùng gen gây bệnh này thì vi khuẩn sẽ không có tính độc. TTSS gián tiếp hấp thu vi khuẩn vào trong tế bào biểu mô. SPI-1 gián tiếp xâm lấn vào tế bào không phải là thực bào và SPI-2 tạo điều kiện cho *Salmonella* sống sót và sao chép bên trong các đại thực bào.

51.3.1.2. Nội độc tố

Nội độc tố có vai trò chính trong nhiều biểu hiện bệnh toàn thân do *Salmonella* spp. gây ra.

51.3.1.3. Thể tua

Thể tua thì chuyên biệt cho loài và có vai trò trong việc tạo cầu nối trung gian cho *Salmonella* gắn với tế bào M (microfold) hiện diện trong mảng Peyer thuộc phần cuối của ruột non. Các tế bào M này tiêu biểu cho sự vận chuyển các kháng nguyên lạ như vi khuẩn chẳng hạn, đến các đại thực bào để làm sạch.

51.3.1.4. Gen phản ứng sự dung nạp acid

Gen phản ứng sự dung nạp acid (ATR) bảo vệ *Salmonella* spp. thoát khỏi acid dạ dày và pH acid của thể thực bào (phagosome), nhờ đó tạo thuận lợi cho vi khuẩn sống sót bên trong thể thực bào.

51.3.1.5. Enzyme

Catalase và superoxide dismutase là các enzyme bảo vệ vi khuẩn thoát khỏi sự tiêu diệt bên trong các đại thực bào.

Bảng 51.4. Yếu tố gây độc của *Salmonella* spp.

Yếu tố gây độc	Chức năng
Nội độc tố	Gây nhiều biểu hiện bệnh toàn thân do salmonella
Hệ thống các chất tiết kiểu III	Gián tiếp tiết các yếu tố độc vào tế bào chủ

Thể tua	Tạo cầu nối trung gian để Salmonella dính lên tế bào M (microfold) có trong mảng Peyer nằm trong phần cuối của ruột non.
Gen phản ứng với sự dung nạp acid (ATR)	Bảo vệ <i>Salmonella</i> spp. khỏi acid dạ dày và pH thấp của thể thực bào (phagosome)
Catalase	Bảo vệ vi khuẩn khỏi sự tiêu diệt nội bào trong các đại thực bào
Superoxide dismutase	Bảo vệ vi khuẩn khỏi sự tiêu diệt nội bào trong các đại thực bào

51.3.2. Phát sinh bệnh thương hàn

Tính nghiêm trọng của cá thể bị nhiễm phụ thuộc vào yếu tố gây độc của chủng đang nhiễm cũng như cơ thể người.

51.3.2.1. Liều xâm nhiễm

Xâm nhiễm mắc phải do tiêu thụ thực phẩm hoặc nước bị nhiễm salmonella. Liều xâm nhiễm 50% (ID₅₀) ở những người tình nguyện thử nghiệm là khoảng 10^3 - 10^6 tế bào vi khuẩn. Mặc dù liều xâm nhiễm này thì dao động giữa các chủng, cũng như cần phải một lượng lớn tế bào vi khuẩn để vượt qua acid dạ dày và cạnh tranh được với hệ vi khuẩn đường ruột. Lượng vi khuẩn lớn cũng làm cho tỷ lệ mắc bệnh cao hơn và thời gian ủ bệnh ngắn hơn. Tuy nhiên liều xâm nhiễm thấp cũng có thể đủ để gây xâm nhiễm trong các điều kiện như: (a). khi tiêu thụ với thực phẩm có vi khuẩn nên chúng được nhanh chóng chuyển tới dạ dày, nhất là ở những như thức ăn lỏng hoặc thực phẩm làm tăng pH dạ dày như phô mai, sữa, ... (b). Sử dụng chất chống acid đi kèm; hoặc (c). Vi khuẩn được đưa vào cơ thể có hệ miễn dịch bị khiếm khuyết.

Khi tiếp xúc với ruột, salmonella sử dụng thể tua và tiên mao để bám vào lớp trong của niêm mạc hồi tràng. Vi khuẩn sẽ bám một cách có chọn lọc lên những tế bào biểu mô chuyên biệt (tế bào M) của mảng Peyer. Hệ các chất tiết kiểu III của *Salmonella* (TTSS) làm trung gian cho sự xâm lấn ban đầu của *S. Typhi* vào màng nhày của ruột. Vùng gen gây bệnh 1 của Salmonella (SPI-1) sản sinh ra các protein xâm lấn (protein Sips hay Ssps), protein này đi vào các tế bào M làm cho màng tế bào gấp nếp lại. Màng gấp nếp này sẽ bao

và nuốt tế bào salmonella, dẫn đến sự sao chép nội bào xảy ra bên trong túi thực bào (phagosome), kế tiếp là làm chết tế bào chủ và vi khuẩn sẽ lan ra các tế bào biểu mô kế cận cũng như lan ra mô lympho. Gen ATR cũng bảo vệ *Salmonella* spp. thoát khỏi acid dạ dày và pH acid của túi thực bào. Catalase và superoxide dismutase là những yếu tố khác bảo vệ vi khuẩn thoát khỏi sự tiêu diệt bên trong thực bào. Sau đó vi khuẩn được chuyển từ thể thực bào đến lớp đệm niêm mạc (lamina propria), tại đây chúng được phóng thích. Trong lớp đệm niêm mạc, các chủng salmonella thương hàn cảm ứng sản sinh đại thực bào, trong khi đó các chủng không thương hàn cảm ứng sản sinh ra bạch cầu trung tính. Kế tiếp là *S. Typhi* và các chủng *Salmonella* gây bệnh khác xâm nhập sâu hơn vào mô thông qua đường bạch huyết và mao quản và làm xuất hiện phản ứng miễn dịch. Vi khuẩn di chuyển dưới lớp niêm mạc đến các hạch bạch huyết mạc treo, nhân lên và sau đó xâm nhập vào máu thông qua ống ngực (thoracic duct) làm xuất hiện du khuẩn huyết sơ cấp thoáng qua (transient primary bacteremia) để từ đó lan ra các mô khác.

Trong pha du khuẩn huyết này, vi khuẩn có thể xâm lấn bất kỳ cơ quan nào nhưng phổ biến nhất là mô lưới nội mô của gan, lách, tủy xương, túi mật và mảng Peyer nằm ở đầu cuối hồi tràng. Túi mật bị nhiễm qua đường gan và dẫn đến làm xuất hiện chứng viêm túi mật. Mật bị nhiễm làm cho phân có vi khuẩn. Nếu túi mật bị nhiễm trước đó sẽ làm cho viêm đường mật mạn tính, làm người mang khuẩn thải khuẩn lâu dài qua đường phân.

Sự xâm lấn vào mảng Peyer xảy ra trong quá trình hoặc là do quá trình nhiễm khuẩn đường ruột sơ cấp hoặc là do du khuẩn huyết thứ cấp (secondary bacteremia), và sự lây lan rộng rãi của vi khuẩn xảy ra thông qua mật bị nhiễm. Mảng Peyer trở nên tăng sản (hyperplastic) cùng với đó là sự thâm nhiễm (infiltration) của các tế bào bị viêm mạn tính, điều này có thể dẫn đến làm hoại tử lớp nông (cạn) và tạo ra sự lở loét, cùng với đó là khả năng xuất huyết do sự bào mòn của mạch máu hay xuất hiện chứng viêm phúc mạc (peritonitis) do sự xuyên màng.

Sự phát sinh bệnh sẽ kéo dài triệu chứng sốt và nhiễm độc máu do độc tố (toxemia) của bệnh sốt thương hàn thì chưa được hiểu rõ. Chất gây sốt (pyrogen) và những yếu tố trung gian được tạo ra tại các vị trí viêm được cho là các yếu tố gây ra sốt kéo dài.

51.3.2.2. Miễn dịch của cơ thể chủ

Salmonella spp. chủ yếu là vi khuẩn gây bệnh nội bào, vì vậy miễn dịch qua trung gian tế bào (CMI) đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể chống lại bệnh cao hơn so với miễn dịch dịch thể. CMI được phát triển trong suốt thời gian xảy ra bệnh và xuất hiện thường xuyên trong các quần thể ở những khu vực có dịch sốt thương hàn. Các cá thể bị suy giảm CMI sẽ nhạy cảm hơn với sự xâm nhiễm của *S. Typhi*.

Ở trường hợp cấp tính, trước tiên kháng thể O xuất hiện, tăng lên từ từ, sau đó giảm xuống và biến mất trong khoảng vài tháng; kháng thể H xuất hiện ở mức độ tăng nhẹ nhưng kéo dài lâu hơn. Nhìn chung lượng kháng thể O tăng lên biểu thị cho sự xâm nhiễm cấp tính, ngược lại mức kháng thể H tăng lên giúp xác định kiểu sốt thương hàn.

51.3.2.3. Triệu chứng bệnh

S. Typhi gây sốt thương hàn, trong khi đó *S. Paratyphi A*, *Salmonella* Schottmuelleri (trước đây gọi là *S. Paratyphi B*) và *Salmonella* Hirschfeldii (trước đây gọi là *S. Paratyphi C*) gây bệnh ở hình thức nhẹ hơn gọi là sốt phó thương hàn. Thuật ngữ bệnh thương hàn gồm sốt thương hàn và sốt phó thương hàn do các loài *Salmonella* spp này gây ra.

51.3.2.4. Bệnh thương hàn

Bệnh thương hàn thường là bệnh cấp tính biểu hiện các triệu chứng như sốt, nhức đầu và đau bụng. Giai đoạn ủ bệnh thường từ 7 đến 14 ngày, nhưng có thể kéo dài trong khoảng từ 3 đến 56 ngày. Bệnh thường tấn công từ từ, xuất hiện các triệu chứng như nhức đầu, tình trạng khó ở, biếng ăn, bực lười và rối loạn đường ruột cùng với đó là chứng táo bón hoặc bị tiêu chảy. Sốt tăng dần theo bậc thang cùng với đó là nhịp tim chậm tương đối và nhiễm độc huyết là đặc điểm điển hình. Bệnh làm cho lách mềm và gan to ra. Các triệu chứng này xuất hiện trong một tuần hoặc nhiều hơn và theo sau là các triệu chứng dạ dày ruột. Giai đoạn này tương ứng với giai đoạn nhiễm trùng huyết ban đầu, theo sau là sự tập kết của vi khuẩn vào túi mật và sau đó tái nhiễm vào ruột.

Xuyên qua ruột, xuất huyết nghiêm trọng và tuần hoàn suy giảm (circulatory collapse) là những biến chứng quan trọng nhất. Viêm não do nhiễm độc (toxic encephalopathy), khối kết trong mạch máu não (cerebral thrombosis), viêm gan, viêm tụy, viêm khớp và viêm cơ là những biến chứng khác. Phục hồi diễn ra chậm. Sự tái phát thì phổ biến sau khi bắt đầu phục hồi ở 10 - 20% bệnh nhân được điều trị bằng kháng sinh.

Tái phát thường xảy ra trong khoảng 1 tuần sau khi ngừng liệu pháp điều trị, thậm chí xuất hiện sau 2 tháng. Tái phát thường nhẹ hơn và ngắn hơn bệnh ban đầu. Hiếm khi xuất hiện tái phát lần hai hoặc lần ba. Trong trường hợp tái phát sẽ phát hiện có vi khuẩn trong máu và huyết thanh H, O cùng kháng thể Vi.

Sốt phó thương hàn do *S. Paratyphi* A và B gây ra tương tự như sốt thương hàn nhưng nhẹ hơn. *S. Paratyphi* C cũng có thể gây sốt phó thương hàn nhưng phổ biến hơn là làm nhiễm trùng máu cùng với những biến chứng làm mưng mủ.

51.3.2.5. Viêm dạ dày ruột do *Salmonella*

Viêm dạ dày ruột do *Salmonella* là dạng phổ biến nhất. Viêm dạ dày ruột do *Salmonella* hay ngộ độc thực phẩm thường là bệnh lan truyền từ động vật do một số loài salmonella không gây bệnh thương hàn gây ra, các loài này chủ yếu là đối tượng gây bệnh ở động vật. *S. Typhimurium* là loài phổ biến nhất gây bệnh trên toàn thế giới. Một số loài phổ biến khác gồm *S. Enteritidis*, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Heidelberg, *S. Agona*, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Seftenberg, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Newport và *Salmonella* Anatum.

Bệnh ở người thường xảy ra là do tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm. Nguồn phổ biến nhất của salmonella là sữa và các sản phẩm từ sữa, thịt, gia cầm và trứng. Đáng chú ý trứng và sản phẩm từ trứng. Khi trứng tiếp xúc với nguồn thức ăn của gà hay nguồn phân bị nhiễm thì salmonella có thể xâm nhập vào vỏ và phát triển bên trong quả trứng. Phân chuột, thằn lằn (thạch sùng) hay các động vật nhỏ khác cũng có thể là nguyên nhân gây nhiễm khuẩn cho thực phẩm. Khi trái cây, rau, sản phẩm từ sữa và nhuyển thể được chế biến không thích hợp có thể là nguyên nhân gây nhiễm do xử lý trong điều kiện kém vệ sinh.

Thời gian ủ bệnh 6 - 72 giờ. Buồn nôn, nôn mửa và tiêu chảy là những triệu chứng phổ biến. Sốt, đau bụng quặn, đau cơ và đau đầu cũng là những triệu chứng thường gặp. Sốt hiếm khi vượt quá 39°C, xảy ra ở 1/2 số bệnh nhân. Các triệu chứng thường tự chấm dứt trong 2 - 7 ngày.

51.3.2.6. Du khuẩn huyết do *Salmonella*

Tất cả *Salmonella* spp. có thể gây du khuẩn huyết. Tuy nhiên *S. Choleraesuis*, *S. Paratyphi* và *S. Typhi* là những vi khuẩn phổ biến hơn gây chứng du khuẩn huyết. Trẻ em

và người lớn tuổi cũng như các bệnh nhân bị bệnh AIDS nhạy cảm hơn với *Salmonella* và vì vậy dễ bị du khuẩn huyết. Triệu chứng lâm sàng của chứng du khuẩn huyết do *Salmonella* thì giống như chứng du khuẩn huyết do các vi khuẩn Gram âm khác. Tuy nhiên nhiễm trùng mưng mủ cục bộ như chứng viêm tuỷ xương, áp se sâu, viêm màng trong tim, viêm khớp và viêm màng não có thể xuất hiện ở 10% bệnh nhân. Tỷ lệ các ca chết có thể cao lên đến 25%. Phát hiện bệnh này bằng cách phân lập salmonella từ máu hoặc từ mủ xanh tổn thương mưng mủ và không nên phân lập từ phân.

51.4. Dịch tễ học

51.4.1. Phân bố

Bệnh thương hàn là bệnh dịch cục bộ ở nhiều nước đang phát triển trên thế giới và chủ yếu ở những nước đang phát triển có điều kiện vệ sinh kém. Bệnh thương hàn thành dịch cục bộ ở tiểu lục địa Ấn Độ, Đông Nam Á và Viễn Đông, Trung Đông, Trung Mỹ và Nam Mỹ. Mỗi năm trên thế giới có khoảng 12 - 13 triệu trường hợp bị bệnh sốt thương hàn và trong đó có 600.000 trường hợp bị chết. Bệnh thương hàn đã được xóa bỏ gần như hoàn toàn ở các nước phát triển nhờ cải thiện nguồn nước cung cấp và điều kiện vệ sinh trong nhiều thập kỷ qua.

Bệnh phó thương hàn vẫn còn là vấn đề về sức khỏe ở các quốc gia đang phát triển và đã phát triển. *S. Paratyphi A* phổ biến ở Ấn Độ và các quốc gia Châu Á khác, Đông Âu và Nam Mỹ; *S. Paratyphi B* ở Bắc Mỹ, Anh Quốc và Tây Âu và *S. Paratyphi C* ở Đông Âu và Guyana.

51.4.2. Môi trường sống

S. Typhi và *S. Paratyphi* (A, B và C) là những vi khuẩn gây bệnh. Chúng không được phát hiện trong bất kỳ động vật chủ nào. Các khuẩn này tập kết trong ruột non nhất là niêm mạc hồi tràng ở những cơ thể chủ bị nhiễm. Vi khuẩn này thường tập kết trong cơ thể chủ bị nhiễm một thời gian dài mà không biểu hiện bệnh xảy ra. Các salmonella khác ký sinh trong nhiều động vật nuôi, gặm nhấm, rùa và chim. *S. Typhimurium* có trong nhiều vật chủ gồm động vật, chim và người, ngược lại *Salmonella Abortus-equi* chỉ phát hiện có trong ngựa, *Salmonella Abortus-oris* có trong cừu và *S. Gallinarum* có trong gia cầm.

51.4.3. Nguồn truyền nhiễm

Người bị nhiễm và thường xuyên hơn là người mang khuẩn là nguồn lây nhiễm quan trọng bệnh thương hàn.

(a). Người mang khuẩn trong giai đoạn phục hồi bệnh: người bệnh liên tục tiết ra trực khuẩn thương hàn qua đường phân trong 3 tuần đến 3 tháng sau điều trị.

(b). Người mang khuẩn tạm thời: là những người thải vi khuẩn này trên 3 tháng nhưng nhỏ hơn 1 năm.

(c). Người mang khuẩn mạn tính: là những người thải vi khuẩn này trên 1 năm. Khoảng 2 - 4% người bệnh sẽ mang khuẩn mạn tính. Trực khuẩn này kiên trì trong túi mật và được tiết ra ngoài theo đường phân hoặc tồn tại lâu dài trong thận và được tiết ra ngoài theo đường tiêu. Người mang khuẩn thải ra theo đường tiêu thì ít gặp hơn và thường có đi kèm với một số bệnh về tiết niệu như sỏi thận hoặc bệnh do sán lá schistosomia so với người mang khuẩn thải ra theo đường phân.

Người mang khuẩn thường gặp ở nữ giới hơn là ở nam giới và ở người già trên 40 tuổi so với người trẻ. Người chế biến thực phẩm hay người nấu nướng mang khuẩn sẽ là mối nguy tiềm ẩn cho lây nhiễm cộng đồng. Ví dụ điển hình cho trường hợp này là Mary Mallon còn gọi là Typhoid Mary, một thợ nấu ở New York là một trường hợp kinh điển về người mang khuẩn, trong một thời gian dài trên 15 năm, gây ít nhất bảy vụ bùng nổ ngộ độc làm ảnh hưởng đến hơn 200 người.

Người mang khuẩn cũng xảy ra với trường hợp *S. Paratyphi*. Sự xâm nhiễm của *S. Paratyphi* A chỉ xảy ra ở người, ngược lại *S. Paratyphi* B lại xâm nhiễm vào động vật như chó hay cừu. Thực phẩm, rau và nước bị nhiễm phân người có *S. Typhi* là nguồn lây nhiễm phổ biến.

- Nhiễm khuẩn *S. Typhi* xảy ra khi tiêu thụ thực phẩm hay nước uống bị nhiễm từ người xử lý thực phẩm hoặc do điều kiện vệ sinh kém.
- Liều xâm nhiễm của *S. Typhi* thì thấp, vì vậy việc lây lan từ người sang người là phổ biến.
- Liều xâm nhiễm sẽ thấp hơn đối những người có nguy cơ cao về bệnh do tuổi tác, sự suy giảm miễn dịch hay đang bị bệnh như leukemia, lymphoma, tế bào hình liềm hay bị giảm acid dạ dày.

Động vật không phải là nguồn cung cấp salmonella gây bệnh thương hàn. Sự lan truyền từ động vật sang người thường chỉ là salmonella không gây bệnh thương hàn. Gia cầm, vật nuôi, bò sát và thú kiểng là nguồn lây nhiễm chính salmonella không gây bệnh thương hàn. Con người chúng ta nhiễm salmonella không gây bệnh thương hàn là do tiêu thụ phải thức ăn bị nhiễm chưa được làm sạch hoặc nấu chín kỹ như: trái cây, rau, thực phẩm có nguồn gốc từ động vật bao gồm gia cầm, thịt đỏ, sữa chưa qua thanh trùng và trứng bị nhiễm khuẩn. Việc tiếp xúc với giáp sát bị nhiễm như giông mào, rùa kiểng và rùa cạn cũng như uống nước bị ô nhiễm là những cách lan truyền khác.

51.5. Phân loại và phân kiểu *Salmonella*

51.5.1. Phân loại theo hệ thống Kauffmann - White

Sắp xếp theo hệ thống Kauffmann - White là một phương pháp phân loại các chủng *Salmonella* dựa trên công thức cấu trúc của các kháng nguyên O và H thuộc các chủng cần phân loại, được xác định bằng cách cho ngưng kết với kháng huyết thanh chuyên biệt. Theo đó salmonella được phân thành các nhóm huyết thanh O khác nhau dựa vào sự hiện diện của các yếu tố kháng nguyên O khác biệt. Mỗi nhóm chứa một số kiểu huyết thanh có chung yếu tố O không được tìm thấy ở các nhóm huyết thanh khác. Hiện nay các yếu tố O này được ấn định là 1, 2, 3, 4, Khởi đầu các yếu tố này được ấn định theo các ký tự viết hoa từ Alphabet và sau này bằng số 51 - 67. Một số nhóm huyết thanh (serogroup) được chia thành các nhóm huyết thanh nhỏ hơn hay gọi là phân nhóm huyết thanh (subserogroup) ví dụ C1- C4; E1 - E4. Rõ ràng khi đặt tên cho mỗi nhóm huyết thanh theo số của chính yếu tố kháng nguyên O đặc trưng thì hợp lý hơn so với đặt tên theo ký tự. Vì vậy hiện nay cách đặt tên được đề nghị ấn định là A thành 2, B thành 4, C1 thành 7, C2 thành 8, D thành 9 và vân vân. Ví dụ phân loại một số loài *Salmonella* theo hệ thống Kauffmann - White được minh họa ở Bảng 51.5.

Trong mỗi nhóm huyết thanh O, các kiểu huyết thanh khác nhau được xác định nhờ sự hiện diện của phase 1 và phase 2 thuộc kháng nguyên tiên mao. Cấu trúc kháng nguyên của kiểu huyết thanh *Salmonella* được ấn định bằng công thức kháng nguyên, mà theo đó có ba thành phần mô tả gồm kháng nguyên O, phase 1 kháng nguyên H và phase 2 kháng nguyên H theo thứ tự như trên. Ba phần này được viết tách biệt nhau bằng dấu hai chấm

và thành phần kháng nguyên trong mỗi phần được viết cách bằng dấu phẩy. Phân loại theo hệ thống Kauffmann - White ấn định mỗi serotype là một loài. Và theo đó hiện nay có hơn 2.400 kiểu huyết thanh hay loài *Salmonella* đã được mô tả theo hệ thống phân loại này.

Bảng 51.5. Bảng tóm tắt phân loại *Salmonella* theo hệ thống Kauffmann - White.

Nhóm thanh O	huyết Cũ	huyết Mới	Kiểu huyết (serotype) thanh	Kháng nguyên (và Vi)	Kháng nguyên H	
					Phase 1	Phase 2
A	2		<i>Salmonella</i> Paratyphi A	1,2,12	a	-
B	4		<i>Salmonella</i> Paratyphi B	1,4,5,12	b	1,2
			<i>Salmonella</i> Typhimurium	1,4,5,12	1	1,2
			<i>Salmonella</i> Stanley	4,5,12	d	1,2
			<i>Salmonella</i> Paratyphi C	6,7 (Vi)	c	1,5
C1	7		<i>Salmonella</i> Choleraesuis	6,7	c	1,5
C2	8		<i>Salmonella</i> Muenchen	6,8,20	e,h	1,2
D	9		<i>Salmonella</i> Typhi	9,12 (Vi)	d	-
			<i>Salmonella</i> Enteritidis	4,9,12	g,m	-
			<i>Salmonella</i> Gallinarum	1,9,12	-	-
			<i>Salmonella</i> Pullorum	1,9,12	-	-
E1	3,10		<i>Salmonella</i> Anatum	3,10	e,h	1,6

51.5.2. Phân kiểu thực khuẩn thể

Phân kiểu thực khuẩn thể (bacteriophage typing) là phân loại được thực hiện trong phạm vi loài *S. Typhi*, phân kiểu phage này được Craigie và Yen phát triển lần đầu tiên vào năm 1937. Hai tác giả này đã quan sát khi thực khuẩn thể (bacteriophage) tấn công lên kháng nguyên Vi của *S. Typhi* (Vi phage II) thì vi khuẩn này có tính thích ứng cao. Phage mẹ được biết là phage A. Phage A này có thể chuyên biệt đối với một chủng cụ thể của *S. Typhi* theo cách nhân lên hàng loạt trong chủng vi khuẩn này. Sự thích ứng này thu được là do sự biến đổi về kiểu hình và kiểu gen.

Phân kiểu phage được tiến hành bằng cách chứng minh tính nhạy cảm của các chủng

đối với các biến thể (variant) của phase Vi. Tuy nhiên hầu hết các kiểu khác chỉ nhạy cảm với một hoặc một vài thích nghi có liên quan. Khi phân kiểu phage S. Typhi thì phụ thuộc vào sự có mặt của kháng nguyên Vi, một số chủng không có kháng nguyên Vi thì không thể phân kiểu được. Hiện nay có 97 kiểu phage II Vi thuộc S. Typhi được công nhận.

Để tiến hành phân kiểu thuận lợi và dễ phân biệt hơn, các điểm marker (chỉ dấu) bổ sung được sử dụng để phân chia sâu hơn các chủng thuộc một kiểu phage. Các marker này gồm (a) phân kiểu phage bổ sung của Nicolle, (b) phân kiểu sinh học Kristensen, (c) sản sinh tetrathionate reductase, (d) sản sinh bacteriocin và (e) antibiogram. Phân kiểu phage hữu dụng trong (i) truy tìm dấu vết nguồn gốc dịch tễ và (ii) cung cấp thông tin về xu hướng và kiểu dịch tễ của sốt thương hàn ở cấp độ địa phương, quốc gia và quốc tế. Sơ đồ phân kiểu phage này cũng được áp dụng cho S. Paratyphi A và B, S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Dublin và các kiểu huyết thanh khác.

51.5.3. Phân kiểu sinh học

Phân kiểu sinh học (biotype) là phương pháp thường được sử dụng để phân loại các chủng *Salmonella* khác nhau của một kiểu huyết thanh cụ thể thành nhiều kiểu sinh học nhờ đặc tính sinh hóa của chúng.

Dựa trên 15 đặc tính sinh hóa khác nhau, năm 1975, Duguid và cộng sự đã phân S. Typhimurium thành 144 kiểu sinh học khác nhau. Các đặc điểm sinh hóa tương tự cũng được sử dụng để phân kiểu sinh học S. Paratyphi B, *Salmonella* Montevideo và S. Agona. S. Typhi đã được phân thành các kiểu sinh học khác nhau dựa trên sự lên men đường arabinose, dulcitol và xylose.

Phân kiểu sinh học cũng dùng để bổ sung cho phương pháp phân kiểu phage bởi vì nó giúp chia sâu hơn đối với các chủng không thể phân kiểu phage được hay các thành viên có kiểu phage chung. Ngược lại các chủng có cùng kiểu sinh học có thể được công nhận thành các kiểu phage khác. Chính vì lẽ đó mà sự kết hợp của phương pháp phân kiểu phage và phân kiểu sinh học đem đến khả năng phân biệt tốt hơn về các chủng *Salmonella* so với chỉ sử dụng một phương pháp phân kiểu đơn lẻ.

51.5.4. Phương pháp phân tử:

Hiện nay phương pháp phân kiểu gen (genotyping) như fingerprinting plasmid, điện

di multilocus enzyme (MEE), IS-200 profiling và phân tích RAPD (random amplified polymorphic DNA) được sử dụng như là những phương pháp phân biệt sâu hơn về đặc điểm dịch tễ học của *Salmonella*.

51.6. Phát hiện tại phòng thí nghiệm

Tại phòng thí nghiệm, phát hiện *Salmonella* gây bệnh sốt thương hàn được dựa trên phương pháp sau:

- (1). Phân lập *Salmonella* spp. bằng nuôi cấy,
- (2). Sử dụng huyết thanh để chứng minh kháng thể từ cơ thể chủ do *Salmonella* xâm nhiễm và kháng nguyên của *Salmonella*, và
- (3). Sử dụng mẫu dò DNA và PCR.

51.6.1. Mẫu vật

Máu, máu cục, tủy xương và phân là mẫu vật phổ biến được sử dụng để phân lập salmonella gây bệnh thương hàn. Các mẫu khác gồm dịch não tủy, dịch phúc mạc (màng bụng), hạch bạch huyết mạc treo ruột, ruột bị cắt bỏ, hầu, amidan, áp se, xương và nước tiểu.

Mẫu thực phẩm, mẫu nước và mẫu môi trường cần phân tích phát hiện khuẩn này.

51.6.2. Nuôi cấy

51.6.2.1. Mẫu bệnh phẩm

(1). Nuôi cấy máu: nuôi cấy máu là quy trình thường được sử dụng để phát hiện vi khuẩn và chẩn đoán sốt thương hàn. Các trường hợp sốt ở tuần đầu tiên sẽ cho kết quả dương khoảng 90%, 75% cho các trường hợp sốt ở tuần thứ hai, 60% trong tuần thứ ba và 25% sau đó cho đến khi sốt lặn đi. Tuy nhiên nuôi cấy máu nhanh chóng cho kết quả âm khi điều trị bằng kháng sinh.

Trong phương pháp này, lấy khoảng 5 - 10 mL máu được lấy từ tĩnh mạch trong điều kiện vô trùng và cấy vào chai nuôi cấy có 50 - 100 mL môi trường lỏng có 0,5% mật. Pha loãng 10 lần máu bằng cách cho 5 - 10 mL máu vào 50 - 100 mL môi trường lỏng có mật bò để trung hòa hoạt động diệt khuẩn của nhiều chất hiện diện trong máu. Việc thêm chất lỏng ví dụ như sodium polyanethol sulfonate nhằm trung hòa hơn nữa hoạt tính diệt khuẩn của máu. Chai nuôi cấy máu được ủ ở 37°C trong thời gian trên 7 ngày. Sau khi ủ

qua đêm ở 37°C, cấy chuyển từ môi trường tăng sinh sang môi trường thạch Mac Conkey. Nuôi cấy máu thường cho kết quả dương tính khoảng 90% các trường hợp bị sốt ở tuần đầu tiên, 75% các trường hợp ở tuần thứ 2, 60% ở tuần thứ 3 và sau đó là 25% cho đến khi sốt lắng xuống. Tuy nhiên khi điều trị bằng kháng sinh thì nuôi cấy máu sẽ cho kết quả âm.

(2). Phương pháp hai pha Castañeda: đây là phương pháp tốt hơn dùng để nuôi cấy nhằm làm giảm nguy cơ lây nhiễm trong quá trình cấy chuyển lặp lại. Phương pháp này có điểm thuận lợi nữa đó là an toàn và kinh tế hơn. Theo đó chai nuôi cấy máu là thạch nghiêng về một bên và được đổ tràn bằng dung dịch mật bò. Sau khi cấy máu, úp ngược chai chứa môi trường thạch nghiêng sao cho bề mặt thạch còn trống và không bị dịch lỏng phủ lên phần nghiêng. Dịch lỏng chỉ phủ phần thấp hơn của thạch nghiêng. Để cấy chuyển, chỉ cần nghiêng chai để cho dịch phủ lên mặt thạch nghiêng và úp lại ở vị trí úp ngược. Nếu mẫu có salmonella thì khuẩn lạc sẽ mọc trên phần thạch nghiêng.

(3). Nuôi cấy cục máu đông: nuôi cấy cục máu đông là phương pháp nhạy hơn nuôi cấy máu, bởi vì một số chất ức chế được phát hiện trong huyết thanh thì không có trong cục máu đông. Điểm thuận lợi khác của phương pháp này đó là huyết thanh được tách từ máu trong quá trình làm đông tụ có thể được chứng minh có kháng nguyên hay kháng thể của *Salmonella*.

Trong phương pháp này, ở điều kiện vô trùng nghiêm ngặt thu thập 5 mL máu từ bệnh nhân cho vào ống nghiệm vô trùng và làm đông tụ. Huyết thanh được hút ra để thử nghiệm huyết thanh. Khối đông được bẻ gãy bằng que thủy tinh vô trùng và sau đó thêm dịch mật bò có streptokinase (100 đơn vị/mL).

Streptokinase tạo thuận lợi cho dễ ly giải cục máu đông phóng thích vi khuẩn bị bẫy vào trong khối đông tụ. Dịch mật bò này được ủ và cấy chuyển vi khuẩn lên môi trường tương tự như môi trường dùng để cấy máu.

(4). Nuôi cấy tủy xương: nuôi cấy tủy xương là phương pháp nhạy nhất. Cho kết quả dương tính trong hầu hết các trường hợp ngay cả khi nuôi cấy máu cho kết quả âm. Phương pháp này cũng cho kết quả dương ngay cả khi bệnh nhân đã sử dụng kháng sinh trong một vài ngày, không quan tâm đến người bệnh đã bị sốt bao lâu. Thử nghiệm này được khuyến cáo sử dụng cho những bệnh nhân có kết quả nuôi cấy máu âm tính do sử

dụng kháng sinh trước đó.

(5). Nuôi cấy phân: nuôi cấy phân cũng là phương pháp hữu dụng bởi vì salmonella được tiết ra theo đường phân từ người bệnh hoặc người đã phục hồi với tần suất thay đổi. Thu thập phân từ người bệnh và chuyển ngay đến phòng thí nghiệm. Nếu không chuyển ngay phân phải được cho vào môi trường vận chuyển cho đệm glycerol saline. Mẫu phân được cấy trực tiếp trên môi trường MacConkey, DCA và Wilson - Blair. Môi trường Wilson - Blair là môi trường có tính chọn lọc cao.

Khi tăng sinh, cấy khuẩn vào ống nghiệm có môi trường lỏng tetrathionate và ủ ở 35 - 37°C trong 12 - 18 giờ trước khi cấy chuyển sang môi trường chọn lọc. Các đĩa môi trường chọn lọc sau cấy khuẩn được ủ qua đêm. Trên môi trường Wilson - Blair, *S. Typhi* tạo khuẩn lạc có kích thước lớn, màu đen, cùng với đó là ánh kim. Trên môi trường này, *S. Paratyphi A* hình thành khuẩn lạc màu xanh do không sinh H_2S . Trên môi trường MacConkey và DCA, salmonella hình thành khuẩn lạc mờ do không lên men được lactose. Chọn khuẩn lạc điển hình để tiến hành thử nghiệm sinh hóa.

(6). Nuôi cấy các mẫu bệnh phẩm khác: Salmonella có thể được phân lập từ một số mẫu bệnh phẩm, nhưng thường không phổ biến. Các mẫu này gồm nước tiểu, mật, mủ từ tổn thương mưng mủ, CSF và đờm. Nuôi cấy có thể thu nhận từ bọt đái, gan, lách và hạch bạch huyết mạch treo ruột. Phân lập vi khuẩn từ máu và cục máu hay tủy xương là chẩn đoán quyết định về sốt thương hàn. Nuôi cấy phân cũng được áp dụng nhưng người mang khuẩn và người bệnh đều cho kết quả dương. Nuôi cấy mật cũng được áp dụng để phát hiện vi khuẩn ở người mang vi khuẩn này.

51.6.2.2. Mẫu thực phẩm

Các phương pháp phân tích thực phẩm thường được tiến hành trên 25 g mẫu phân tích. Tỷ lệ mẫu/môi trường tăng sinh là 1:9. Do nền mẫu thực phẩm rất đa dạng và phức tạp nên cần phải chia nhóm để có phương pháp xử lý cho phù hợp, cụ thể như sau:

(1). Lòng đỏ trứng khô, lòng trắng trứng khô, trứng khô, sữa dạng lỏng (sữa, sữa tách béo, sữa 2% béo, nước sữa) và hỗn hợp bột để làm bánh, bột công thức cho trẻ và thức ăn dặm có sữa:

Mẫu dạng này thường không rắn đông trước khi phân tích. Nếu rắn đông phải được

làm mền để thu nhận phần cần phân tích, rã đông càng nhanh càng tốt để giảm thiểu thấp nhất vi sinh vật cạnh tranh gia tăng số lượng hoặc làm giảm các vi khuẩn *Salmonella* đã bị tổn thương. Nên rã đông dưới 45°C trong thời gian <15 phút, có thể sử dụng bể điều nhiệt có cánh khuấy và kiểm soát nhiệt độ để rã đông hoặc rã đông ở 2 - 5°C trong 18 giờ. Lấy 25 g mẫu cho vào vật chứa có dung tích 500 ml, nếu sản phẩm không phải bột thêm 225 ml môi trường lỏng lactose. Nếu sản phẩm là bột, thêm 15 ml môi trường lỏng lactose và khuấy đều, sau đó thêm dung dịch lactose cho đủ 225 ml. Khuấy tan hoàn toàn. Để yên trong 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn đều và xác định pH và điều chỉnh về 6,8 ± 0,2 bằng NaOH 1 N hoặc bằng HCl 1 N nếu cần thiết. Ủ ở 35° C - 37°C/ 24 ± 2 giờ trước khi cấy chuyển.

(2). Mẫu trứng

(a). Trứng còn vỏ: không sử dụng trứng bị nứt vỡ, bị rạn nứt hoặc bị bể để làm mẫu. Loại bỏ vật liệu bám từ bề mặt vỏ trứng. Khử trùng bề mặt trứng bằng dung dịch chứa ba phần cồn 70% dạng ethyl hoặc isopropyl và một phần dung dịch iodine/potassium iodide. Chuẩn bị dung dịch cồn 70% bằng cách thêm 700 ml cồn 100% vào nước cất vô trùng cho đủ 1.000 ml hoặc pha loãng 700 ml cồn 95% bằng nước cất sao cho thể tích cuối bằng 950 ml. Điều chế dung dịch iodine/potassium iodide bằng cách hòa tan 100 g potassium iodide trong 200 - 300 ml nước cất vô trùng. Thêm 50 g iodine và đun nóng nhẹ để iodine tan hoàn toàn. Pha loãng dung dịch iodine/potassium iodide thành 1.000 ml bằng nước cất vô trùng. Bảo quản dung dịch iodine/potassium iodide trong vật chứa thủy tinh tối màu có nắp nếu không sử dụng ngay. Điều chế dung dịch khử trùng bằng cách cho dung dịch 250 ml iodine/potassium iodide vào 750 ml cồn 70% và trộn đều. Nhấn chìm trứng vào dung dịch khử trùng trong 10 giây. Lấy trứng ra khỏi dung dịch và để khô. Mỗi mẫu phải gồm 20 trứng, với tổng là 50 trứng cho mỗi chuồng gia cầm. Trong điều kiện vô trùng sử dụng găng tay cho trứng bị rạn nứt vào vật chứa phù hợp, thay găng tay cho mỗi mẫu. Trộn các mẫu bằng dụng cụ vô trùng cho đến khi lòng đỏ trộn hoàn toàn với lòng trắng trứng, thay găng tay cho từng mẫu. Tiêm tăng sinh 20 trứng/mẫu bằng cách thêm 2 L môi trường lỏng trypticase soy và trộn đều. Đậy chắc và ủ ở 24 ± 2 giờ ở 35° C - 37° C.

(b). Trứng dạng lỏng đã đông nhất: kết hợp 15 trứng 25 ml phân thử nghiệm cho

vào bình Erlenmeyer 6 lít có 375 ml composite. Composite được giữ ở nhiệt độ phòng 20 - 24°C trong 96 ± 2 giờ. Sau thời gian này thêm 3,375 ml TSB có bổ sung sulfate sắt và trộn đều. Để yên trong 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn đều và xác định và điều chỉnh pH nếu $6,8 \pm 0,2$ cần thiết. Ủ ở 35° C - 37° C trong 24 ± 2 giờ.

(c). Trứng đã luộc chín: nếu các vỏ trứng vẫn còn nguyên vẹn, khử trùng vỏ và tách vỏ ra khỏi trứng. Nghiền trứng (lòng đỏ trứng và lòng trắng trứng), 25 g cho vào vật chứa thích hợp, thêm 225 ml TSB (không có sulfate sắt) và trộn đều.

(3). Sữa khô không béo

(a). Sữa ăn nhanh: 25 g mẫu nhẹ nhàng cho vào trên bề mặt 225 ml dung dịch brilliant green trong vật chứa thích hợp. Ủ ở 35°C - 37°C trong 24 ± 2 giờ. Điều chế dung dịch brilliant green bằng cách cho vào 2 ml dung dịch brilliant green 1% vào 1.000 ml nước cất vô trùng.

(b). Sữa không ăn ngay, sữa bột nguyên kem: xử lý mẫu tương tự như sữa bột tách béo sử dụng liên ngoại trừ đơn vị phân tích là 25 g.

(4). Casein: đối với lactic casein, 25 g mẫu cho vào vật chứa phù hợp sau đó thêm 225 ml môi trường tiền tăng sinh. Đối với rennet casein, Sodium caseinate, 25 g mẫu cho vào vật chứa phù hợp sau đó thêm 225 ml môi trường môi trường lỏng lactose. Điều chỉnh pH và ủ ở 35°C - 37°C trong 24 ± 2 giờ.

(5). Sản phẩm tươi, đông lạnh hay khô: tốt nhất là không nên xả đông mẫu trước khi phân tích. Nếu mẫu đông lạnh phải được làm mềm để lấy được phần cần phân tích, rã đông dưới 45°C trong thời gian <15 phút, có thể sử dụng bể điều nhiệt có cánh khuấy và kiểm soát nhiệt độ để rã đông hoặc rã đông ở 2-5°C trong 18 giờ.

(6). Sản phẩm chứa trứng (như mì, chả giò trứng, mì ống, spaghetti), phô mai, bột nhào, xà lách trộn sẵn (giăm bông, trứng, thịt gà, cá ngừ, gà tây), trái cây, hạt, giáp xác như tôm, cua, tôm sông, tôm hùm nhỏ (langostino), tôm hùm và cá: 25 g mẫu cho vào vật chứa phù hợp sau đó thêm 225 ml môi trường lỏng lactose, đập mẫu trong 2 phút. Điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$, nếu cần. Ủ ở 35° C - 37° C/ 24 ± 2 giờ.

(7). Rau: 25 g mẫu cho vào vật chứa phù hợp sau đó thêm 225 ml môi trường lỏng tiền tăng sinh (UP) và trộn đều. Ủ ở 35° C - 37° C/ 24 ± 2 giờ.

(8). Nấm men khô còn hoạt tính và bất hoạt: 25 g mẫu vào 225 ml môi trường lỏng trypticase soy. Trộn đều để hình thành huyền phù nhẵn. Để yên 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn đều, xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần. Ủ ở $35^\circ\text{C} - 37^\circ\text{C}/24 \pm 2$ giờ.

(9). Lớp phủ hoặc hỗn hợp phủ: 25 g mẫu vào 225 ml môi trường dinh dưỡng lỏng, để ở nhiệt độ phòng trong 60 ± 5 phút. Trộn đều, xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần. Ủ ở $35^\circ\text{C} - 37^\circ\text{C}/24 \pm 2$ giờ.

(10). Gia vị

(a). Tiêu đen, tiêu sọ, hạt cần tây, bột ớt, thì là, bột ớt paprika, ngò tây thái, hương thảo, hạt mè, xạ hương và rau thái: 25 g mẫu vào 225 ml môi trường lỏng trypticase soy (TSB) và trộn đều. Để yên 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn đều, xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần. Ủ ở $35^\circ\text{C} - 37^\circ\text{C}/24 \pm 2$ giờ.

(b). Hành lát, bột hành, tỏi lát. 25 g mẫu vào 225 ml TSB có bổ sung K_2SO_3 (5 g K_2SO_3 per 1000 ml TSB, để có nồng độ cuối K_2SO_3 là 0,5%, thanh trùng bằng nồi hấp), trộn đều.

(c). Bột tiêu Jaimaica, quế, đinh hương và oregano: đến thời điểm này chưa cho phương pháp nào dùng để trung hòa độc tính của bốn gia vị này. Pha loãng chúng dựa trên mức độ độc để tiến hành phân tích. Kiểm tra bột tiêu Jaimaica, quế và oregano ở tỷ lệ pha loãng là 1:100 mẫu/dịch pha loãng và đối với đinh hương là 1:1000 mẫu/dịch pha loãng. Phân tích gia vị dạng lá thì tỷ lệ pha loãng mẫu/ dịch pha loãng lớn hơn 1:10 là do đối mặt với khó khăn về hấp thu của sản phẩm khử nước.

(11). Kẹo và lớp phủ kẹo bao gồm cả chocolate: 25 g mẫu cho vào khoang chứa vô trùng thêm 225 ml sữa khô không béo đã hoàn nguyên vô trùng và trộn trong 2 phút. Sau đó chiết sang vật chứa phù hợp và để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 ± 5 phút. Trộn đều và xác định pH $6,8 \pm 0,2$ nếu cần thiết. Kế tiếp thêm 0,45 ml dung dịch chất nhuộm brilliant green 1% và trộn đều. Ủ ở $35^\circ\text{C} - 37^\circ\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ.

(12). Dừa: cho 25 g vào 225 ml môi trường lỏng lactose, lắc đều và để yên 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn đều và xác định pH $6,8 \pm 0,2$ nếu cần thiết. Thêm trên 2,25 ml Tergitol Anionic 7 đã hấp (15 phút) và trộn đều. Cách khác sử dụng Triton X -100 đã hấp

(15 phút). Sử dụng một cách có giới hạn các chất bề mặt này để hạn chế thấp nhất lượng cần thiết để tạo bọt ban đầu. Đối với lượng Triton X-100 này có thể là 2 hoặc 3 giọt. Ủ ở 35° C - 37° C trong 24 ± 2 giờ.

(13). Phẩm nhuộm và chất tạo màu thực phẩm: đối với chất nhuộm pH 6,0 hoặc trên (dịch huyền phù 10%), sử dụng phương pháp xử lý mẫu như đã mô tả cho trứng nguyên khô ở trên. Đối với chất nhuộm màu đỏ tía (laked dye) hay chất nhuộm có pH < 6,0, cân 25 g mẫu cho vào vật chứa phù hợp thêm 225 ml môi trường lỏng tetrathionate không có chất nhuộm brilliant green. Trộn đều và để yên trong 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$. Thêm 2,25 ml brilliant green 0,1% và trộn đều. Ủ ở 35° C - 37° C trong 24 ± 2 giờ.

(14). Gelatin: 25 g cho vào vật chứa thích hợp thêm 225 ml môi trường lỏng lactose và 5 ml dung dịch, trộn đều, xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần thiết. Ủ ở 35°C - 37°C/ 24 ± 2 giờ.

(15). Thịt, chất thay thế thịt, phụ phẩm từ thịt, các chất từ động vật, bột thịt và xương: 25 g mẫu cho vào vật chứa phù hợp thêm 225 ml môi trường lỏng thêm 225 ml môi trường lỏng lactose và đập mẫu trong 2 phút. Để yên trong 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Nếu hỗn hợp là bột hay đã băm hoặc tán nhỏ, thì không cần phải xay. Trộn đều, xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần thiết. Thêm 2,25 ml Tergitol Anionic 7 đã hấp (15 phút) và trộn đều. Cách khác sử dụng Triton X -100 đã hấp (15 phút). Sử dụng một cách có giới hạn các chất bề mặt này để hạn chế thấp nhất lượng cần thiết để tạo bọt ban đầu. Lượng thực tế thì phụ thuộc vào thành phần của vật liệu thử nghiệm. Không cần thiết sử dụng các chất bề mặt khi phân tích các sản phẩm dạng hạt. Ủ ở 35° C - 37°C trong 24 ± 2 giờ.

(16). Đùi ếch: đặt 15 cặp đùi ếch vào bọc nhựa vô trùng cho dung dịch lactose theo tỷ lệ 1:9 (g/ml). Nếu là một đùi lấy khoảng 25 g hoặc nhiều hơn, chỉ kiểm tra một đùi trong lần lượt 15 cặp. Đặt vào vật chứa phù hợp. Trộn đều và để yên 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn đều, xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần thiết. Ủ ở 35°C - 37°C trong 24 ± 2 giờ.

(17). Thịt thỏ: 1 phần thịt 9 phần môi trường lỏng lactose (g/ml) cho vào vật chứa

phù hợp. Trộn đều và để yên trong 60 ± 5 ở nhiệt độ phòng. Trộn đều, xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần thiết. Ủ ở 35°C - 37°C trong 24 ± 2 giờ.

(18). Guar gum: 25 g cho vào vật chứa phù hợp, thêm 225 ml môi trường lỏng lactose và 2,25 ml dung dịch cellulase 1%. Để yên trong 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Không cần chỉnh pH, ủ ở 35°C - 37°C trong 24 ± 2 giờ.

Điều chế dung dịch cellulase 1,0 % bằng cách cho 1 g cellulase vào 99 ml nước cất vô trùng. Cho vào chai 150 ml và có thể bảo quản ở $2-5^{\circ}\text{C}$ trong trên 2 tuần.

(19). Nước cam đã hoặc chưa thanh trùng, cider táo đã và chưa thanh trùng pasteur và nước ép táo thanh trùng pasteur: 25 ml mẫu vào vật chứa phù hợp có 225 ml môi trường tiền tăng sinh lên men Universal. Trộn đều và để yên trong 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Ủ ở 35°C - 37°C trong 24 ± 2 giờ.

(20). Tai heo và các dạng khác: cho một miếng hoặc 2-3 miếng nhỏ vào túi nhựa. thêm 9 phần dịch lỏng sao phủ cả miếng tai heo. Trộn heo đều và để yên trong 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn đều, xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần thiết. Thêm chất hoạt động bề mặt Tergitol Anionic 7 vô trùng hoặc Triton X-100 nồng độ 1%. Ví dụ nếu bổ sung 225 ml lactose, thì thể tích chất hoạt động bề mặt tối đa thêm vào là 2,25 ml. Sử dụng một cách có giới hạn chất bề mặt này để hạn chế thấp nhất khả năng hình thành bọt. Ủ ở 35°C - 37°C trong 24 ± 2 giờ.

(21). Dưa ruột vàng: không rửa đông mẫu trước khi phân tích. Nếu mẫu đông lạnh cần phải rửa phần cần phân tích ở nhiệt độ $< 45^{\circ}\text{C}$ trong khoảng thời gian < 15 phút tiếp tục rửa trong bể điều nhiệt kiểm soát có cánh khuấy ở $2-5^{\circ}\text{C}$ trong 18 giờ.

Đối với sản phẩm vụn hay đã cắt miếng, 25 g mẫu cho vào khoang cắt mẫu. Thêm 225 ml môi trường tiền tăng sinh UP (công thức cho 1 lít gồm 5g tryptone 5g Proteose peptone, 15g KH_2PO_4 , 7g Na_2HPO_4 , 5g NaCl, 0,5g dextrose, 0,25g MgSO_4 , 0,1g Ferric ammonium citrate, 0,2g Sodium pyruvate) và xay trong 2 phút. Chuyển mẫu đã đồng nhất sang vật chứa phù hợp, để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 ± 5 phút. Trộn đều và ủ ở 35°C - 37°C trong 24 ± 2 giờ.

Đối với dưa nguyên trái, không cần rửa ngay cả khi dưa bị bẩn. Quy trình xử lý mẫu như sau: cho dưa vào túi thêm môi trường UP sao cho phủ và gấp 1,5 lần trọng lượng dưa.

Để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 ± 5 phút. Không cần điều chỉnh pH ở $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ.

(22). Xoài: không nên rã đông trước khi phân tích. Nếu mẫu đông lạnh cần phải rã phần cần phân tích ở nhiệt độ $< 45^{\circ}\text{C}$ trong khoảng thời gian < 15 phút tiếp tục rã trong bể điều nhiệt kiểm soát có cánh khuấy ở $2-5^{\circ}\text{C}$ trong 18 giờ.

Đối với sản phẩm vụn hay đã cắt miếng, 25 g mẫu cho vào khoang cắt mẫu. Thêm 225 ml môi trường tiền tăng sinh (BPW) và xay trong 2 phút. Chuyển mẫu đã đồng nhất sang vật chứa phù hợp, để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 ± 5 phút. Trộn đều, xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần thiết, ủ ở $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ

Đối với xoài nguyên trái, không cần rửa ngay cả khi dưa bị bẩn. Quy trình xử lý mẫu như sau: cho xoài vào túi thêm môi trường BPW sao cho phủ và gấp 1,0 lần trọng lượng xoài. Để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 ± 5 phút. Không cần điều chỉnh pH ở $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ trên.

(23). Cà chua: đối với trái cây vụn hay cắt miếng, 25 g mẫu cho vào khoang cắt mẫu. Thêm 225 ml môi trường tiền tăng sinh (UP) và xay trong 2 phút. Chuyển mẫu đã đồng nhất sang vật chứa phù hợp, để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 ± 5 phút. Xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần thiết. Trộn đều và ủ ở $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ.

Đối với cà chua nguyên trái, không cần rửa ngay cả khi dưa bị bẩn. Quy trình xử lý mẫu như sau: cho dưa vào túi thêm môi trường UP sao cho phủ và gấp 1,0 lần trọng lượng cà chua. Để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 ± 5 phút. Không cần điều chỉnh pH ở $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ

(24). Hạt đing lăng (alfalfa) và đậu xanh: cân 25g hạt đing lăng hoặc đậu xanh thêm 225 mL môi trường lỏng lactose vào bình Erlenmeyer trộn đều. Đậy bằng giấy bạc, để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 ± 5 phút. Điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$. Ủ ở $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ.

(25). Hồng xiêm (sapoche): không rã đông mẫu trước khi phân tích. Nếu mẫu đông lạnh cần phải rã phần cần phân tích ở nhiệt độ $< 45^{\circ}\text{C}$ trong khoảng thời gian < 15 phút tiếp tục rã trong bể điều nhiệt kiểm soát có cánh khuấy ở $2-5^{\circ}\text{C}$ trong 18 giờ.

Đối với mẫu hồng xiêm nghi ngờ nhiễm S.Typhi, 25 g mẫu cho vào vật chứa phù

hợp, thêm 225 ml UP không có ferric ammonium citrate , trộn đều và để yên ở nhiệt độ phòng 60 ± 5 phút. Trộn đều và ủ ở $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ.

Với hồng xiêm không nghi ngờ nhiễm *S. Typhi*, 25 g mẫu cho vào vật chứa phù hợp, thêm 225 ml UP, trộn đều và để yên ở nhiệt độ phòng 60 ± 5 phút. Trộn đều và ủ ở $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ.

(26). Rau xanh tươi, thảo mộc và rau mầm (rau bi na, bắp cải, xà lách mỹ, xà lách La mã, rau hỗn hợp, rau mùi cilantro, rau cần, ngò gai/mùi tàu, rau cần Ý, rau đing lăng, giá đỗ, rau ba lá, mầm cải và mầm bông cải): 25 g vào vật chứa phù hợp thêm 225 mL UP (đối với bắp cải thêm 225 ml BPW đã cải biên) và trộn đều bằng tay theo chiều kim đồng hồ 25 lần và ngược chiều kim đồng hồ. ủ ở $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ.

(27). Các mẫu môi trường: mẫu bề mặt môi trường được lấy bằng tăm bông hay miếng xóp dạng bọt biển (swab/sponge). Đặt miếng xóp dạng bọt biển vào bọc Whirl-pak vô trùng hoặc vật chứa tương tự đủ chứa môi trường lỏng Dey - Engley (DE) sao cho ngập.

Chuyển miếng xóp dạng bọt biển vào thùng bảo ôn có bọc gel lạnh để giữ nhiệt độ mát nhưng không được làm đông mẫu. Nếu mẫu không được phân tích ngay, giữ ở nhiệt độ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Mẫu cần phân tích trong vòng 48 ± 2 giờ.

Cho miếng xóp dạng bọt biển vào vật chứa phù hợp có 225 ml môi trường lỏng lactose. Lắc mạnh, để yên 60 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn đều, xác định và điều chỉnh pH về $6,8 \pm 0,2$ nếu cần thiết. Ủ ở $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ.

51.6.3. Xác định vi khuẩn

Khuẩn lạc nghi ngờ được xác định bằng thử nghiệm tính di động, thử nghiệm sinh hóa và ngưng kết trên lam kính với huyết thanh kháng đặc trưng cho *Salmonella*.

51.6.3.1. Thử nghiệm ngưng kết trên lam kính

Thử nghiệm này được tiến hành bằng cách lấy một que cấy vòng đầy vi khuẩn đang tăng trưởng từ môi trường thạch dinh dưỡng hoặc từ dịch huyền phù vi khuẩn cho vào hai giọt nước muối đã chuẩn bị sẵn trên lam kính sạch. Nếu nghi ngờ là *S. Typhi* thì đó là khi không có hơi hình thành từ lên men glucose, một khuyên cấy vòng kháng huyết thanh O (yếu tố 9/nhóm D) được thêm vào một giọt dịch huyền phù vi khuẩn trên lam. Lắc lam nhẹ nhàng. Ngưng kết xảy ra tức khắc chính là chủng *Salmonella* nhóm D.

Xác định *S. Typhi* nhờ phép thử kháng huyết thanh tiên mao (poly H). Đôi khi các chủng phân lập *S. Typhi* còn trẻ xuất hiện ở dạng kiểu V và không ngưng kết với kháng huyết thanh O. Các chủng như vậy có thể thử nghiệm ngưng kết với kháng huyết thanh Vi. Cách khác, thử nghiệm ngưng kết với kháng huyết thanh O bằng cách sử dụng một lượng nhỏ vi khuẩn trong nước muối sau khi đun trong 20 phút. Nếu chủng phân lập là *Salmonella* không gây bệnh thương hàn, chúng sẽ tạo hơi từ lên men đường, tiến hành thử nghiệm ngưng kết với kháng huyết thanh O và H để xác định nhóm A, B, C,

51.6.3.2. Đặc điểm xác định salmonella

Đặc điểm sinh hóa của salmonella được tóm tắt ở Bảng 51. 3.

51.6.3.3. Đặc điểm xác định *Salmonella Typhi*

(1). Trên môi trường thạch MacConkey, khuẩn này hình thành khuẩn lạc mờ không lên men lactose.

(2). Trên môi trường Wilson và Blair's bismuth sulfite agar, khuẩn lạc đen, xung quanh có ánh kim.

(3). Lên men glucose, mannitol và maltose, chỉ hình thành acid nhưng không sinh hơi.

(4). Không khử nhóm decarboxylate của ornithine.

(5). Catalase dương và oxidase âm.

(6). Di động.

(7). H₂S dương, catalase dương, indole âm và oxidase âm.

(8). Ngưng kết với kháng huyết thanh typhoid O dương.

51.6.3.4. Huyết thanh

Huyết thanh của bệnh thương hàn thì dựa trên việc phát hiện kháng thể *Salmonella* đặc trưng có trong huyết thanh hay kháng nguyên trong huyết thanh và cũng có trong nước tiểu bằng nhiều thử nghiệm huyết thanh.

51.6.3.5. Chứng minh kháng thể huyết thanh

(a). **Thử nghiệm Widal:** thử nghiệm Widal là thử nghiệm huyết thanh truyền thống được sử dụng để chẩn đoán sốt thương hàn. Thử nghiệm này được tiến hành xác định sự ngưng kết kháng thể kháng thể chống lại huyết thanh chống lại kháng nguyên tiên mao (H)

và kháng nguyên thân (O) của *S. Typhi* cho trực khuẩn thương hàn và phó thương hàn trong huyết thanh bệnh nhân. Thử nghiệm ngưng kết này được thực hiện trên ống nghiệm ngưng kết hẹp Dreyer, có đáy nhọn dùng để ngưng kết H và ống nghiệm ngắn đáy tròn Felix dùng để ngưng kết O. Kháng nguyên H và O của *S. Typhi* và kháng nguyên H của *S. Paratyphi A* và *B* được sử dụng trong thử nghiệm này. Không sử dụng kháng nguyên paratyphi O vì có phản ứng chéo với kháng nguyên typhoid O do có cùng yếu tố kháng nguyên 12. Kháng nguyên H của *S. Typhi* và *S. Paratyphi A* và *B* được sử dụng riêng lẻ bởi vì kháng nguyên H của vi khuẩn này không biểu hiện bất kỳ phản ứng chéo với nhau. Các chủng *S. Typhi* 901, 'O' và 'H' được sử dụng làm điều chế kháng nguyên.

Kháng nguyên O được điều chế từ chủng *S. Typhi* trên thạch phenol (1:800) và thu nhận vi khuẩn cho vào một lượng thể tích nhỏ nước muối. Sau đó trộn dịch huyền phù nước muối có chứa vi khuẩn với lượng thể tích gấp 20 lần còn tuyệt đối và đun nóng ở 40 - 50°C trong 30 phút, ly tâm và phần lắng được đưa vào trong nước muối với mật độ phù hợp. Sử dụng chloroform để bảo quản. Điều này luôn cần thiết được sử dụng cho các chủng nhằm chuẩn nhằm để điều chế kháng nguyên.

Sau khi điều chế kháng nguyên, mỗi mẻ kháng nguyên cần phải so sánh với chuẩn. Kháng nguyên H được điều chế bằng cách cho formalin 0,1% vào dịch nuôi cấy khuẩn 24 giờ hoặc dịch nước muối huyền phù có chứa các chủng thu nhận trên môi trường thạch.

Thử nghiệm được tiến hành bằng cách lấy đủ một lượng thể tích (0,4 mL) dãy nồng độ pha loãng huyết thanh (từ 1/20 đến 1/640) và kháng nguyên H *S. Typhi* (TH), *S. Paratyphi A* (AH), *S. Paratyphi B* (BH) và kháng nguyên O của *S. Typhi* (TO) và trộn trong ống Dreyer và Felix tương ứng. Sau đó ủ các ống nghiệm này trong bể điều nhiệt ở 37°C qua đêm. Một số khuyến cáo cho rằng nên ủ ở 37°C/ 4 giờ, sau đó ủ qu đêm ở 4°C. Ống kiểm soát chứa kháng nguyên và nước muối bình thường được sử dụng để kiểm tra khả năng tự ngưng kết. Sau thời gia ủ ghi nhận kết quả ngưng kết. Ngưng kết H có đặc điểm bởi sự hình thành khối tụ dạng len lông lẻo (loose, cotton woolly clump), ngược lại ngưng kết O có kiểu trông giống như cái đĩa ở đáy ống nghiệm. Phần dịch nổi vẫn trong suốt ở cả hai ống ngưng kết. Độ pha loãng cao nhất của huyết thanh biểu hiện sự ngưng tụ với kháng nguyên H hay O cho thấy lượng kháng thể trong huyết thanh người bệnh. Tổng hợp kết

qua thử nghiệm Widal được tính toán như sau:

(1). Kháng thể chống lại kháng nguyên H và O thường xuất hiện ở ngày thứ 7 - 10 của bệnh và tăng lên đến tuần thứ 3 và thứ 4, sau đó giảm từ từ. Vì thế máu thu thập trước 7 - 10 sẽ không phát hiện được kháng thể.

(2). Lượng kháng thể tăng gấp 4 lần hoặc nhiều hơn trong mẫu đôi, trong đó một mẫu thu thập trong tuần thứ nhất và mẫu còn lại thu thập ở tuần thứ ba, thì hữu dụng hơn so với việc chứng minh kháng thể trong huyết thanh đơn.

(3). Một lượng 1/100 hoặc nhiều hơn kháng thể O và lượng 1/200 hoặc nhiều hơn kháng thể H thường được cho là sốt thương hàn. Tuy nhiên kết quả thu nhận từ thử nghiệm đơn phải được tổng hợp một cách thận trọng. Hơn nữa điều cần thiết là phải thu nhận mức kháng thể nền trong huyết thanh người bình thường ở những khu vực khác nhau để làm cơ sở cho giá trị nền.

(4). Mức kháng thể tăng có thể có trong huyết thanh người bệnh đã trải qua bệnh thương hàn và trong huyết thanh những cá thể nhiễm khuẩn nhưng không biểu hiện triệu chứng hoặc tiêm chủng vaccine chống lại bệnh sốt thương hàn. Vì vậy việc chứng minh kháng thể trong thử nghiệm Widal không được xem là bằng chứng bệnh sốt thương hàn.

(5). Huyết thanh từ cá thể đã tiêm vaccine TAB có thể có lượng kháng thể cao đối với S. Typhi, S. Paratyphi A và B. Kháng thể H tồn tại trong nhiều tháng sau khi tiêm chủng, nhưng kháng thể O biến mất trong vòng 6 tháng. Tuy nhiên trong trường hợp nhiễm, lượng kháng thể cao sẽ chỉ phát hiện chống lại loài đang xâm nhiễm.

(6). Các cá thể đã trải qua bệnh thương hàn trong quá khứ hay người có miễn dịch có thể phát triển phản ứng nhớ trong quá trình sốt không có liên quan như sốt rét, cúm gia cầm, ... Phản ứng nhớ này chỉ biểu hiện lượng kháng thể tăng trong thời gian ngắn ngủi trong khi đó bệnh thương hàn có lượng tăng kháng thể lâu dài.

(7). Người bệnh được điều trị sớm bằng kháng sinh như chloramphenicol chẳng hạn có thể có phản ứng kháng thể kém.

Độ nhạy, độ đặc hiệu và giá trị tiên đoán của thử nghiệm Widal trong các phòng thí nghiệm thì khác nhau. Sự dao động rộng này là do khác nhau về kháng nguyên, kỹ thuật và quần thể người bệnh. Thử nghiệm Widal chỉ cho kết quả dương trong số 40 - 60% bệnh

nhân bị bệnh sốt thương hàn tại thời điểm tiếp nhận.

(b). Các thử nghiệm huyết thanh khác: hiện nay sẵn có các phương pháp như ngưng kết hồng cầu gián tiếp, điện dịch đôi dòng, phát hiện kháng thể Vi phát huỳnh quang gián tiếp và kỹ thuật ELISA dùng để phát hiện kháng thể immunoglobulin M (IgM) và kháng thể IgG đối với polysaccharide của *S. Typhi* dùng để chẩn đoán sốt thương hàn. Các phương pháp này có độ nhạy và độ đặc hiệu khác nhau. Kháng thể đơn dòng chống lại flagellin của *S. Typhi* cũng được đánh giá là làm tăng độ đặc hiệu của phương pháp phát ELISA đối với kháng thể.

51.6.3.5. Chứng minh kháng nguyên trong huyết thanh

Trong sốt thương hàn, kháng nguyên *S. Typhi* tuần hoàn hiện diện trong huyết thanh cũng như trong nước tiểu, nhưng không có trong huyết thanh của trường hợp đã được điều trị bệnh thương hàn. Vì vậy việc chứng minh kháng nguyên trong huyết thanh luôn luôn biểu thị trạng thái hiện tại hay bệnh thương hàn đang hoạt động. Điện di miễn dịch đôi dòng, thử nghiệm đồng ngưng kết (co-agglutination) và ELISA thường được sử dụng để phát hiện kháng nguyên tuần hoàn trong huyết thanh cũng như trong nước tiểu dùng để chẩn đoán sốt thương hàn. Các kỹ thuật này có độ nhạy và độ đặc hiệu khác nhau.

51.6.4. Phương pháp phân tử

Hiện nay hai phương pháp phân tử thường được sử dụng là mẫu dò DNA, PCR và realtime PCR đang được sử dụng ngày càng tăng để phát hiện và định lượng salmonella trong thực phẩm và bệnh phẩm. Kỹ thuật PCR thường để khuếch đại gen mã hóa cho protein đóng vai trò sự xâm lấn (*invA* gene) của vi khuẩn. Một số đoạn mồi khuếch đại gen *invA* trong kỹ thuật PCR, Realtime PCR và mẫu dò được trình bày tại Bảng 51.6.

Bảng 51.6. Trình tự mồi và mẫu dò dùng để phát hiện và định lượng Salmonella.

Tên mồi	Trình tự
PCR	
<i>invA</i> 1	5' - TTGTTACGGCTATTTTGACCA -3.'
<i>invA</i> 2	5' - CTGACTGCTACCTTGGCTGATG - 3'
Real-time PCR	
Sal1598 F	AACGTGTTTCCGTGCGTAAT

Sal1859 R TCCATCAAATTAGCGGAGGC

Mẫu dò

Sal1631PFAM FAM-TGGAAGCGCTCGCATTGTGG-BHQ

51.7. Điều trị

Các trường hợp có triệu chứng không quá phức tạp do salmonella thì không cần thiết phải sử dụng liệu pháp kháng sinh vì không giúp rút ngắn thời gian của bệnh. Nhưng các trường hợp bị xâm nhiễm nghiêm trọng, thì cần điều trị bằng kháng sinh. Điều trị bằng kháng sinh cho các trường hợp:

(a). Trẻ dưới 3 tháng tuổi bị bệnh viêm dạ dày ruột do *Salmonella* và trẻ dưới 12 tháng tuổi bị sốt cao và nuôi cấy máu có kết quả không rõ.

(b). Bệnh nhân bị rối loạn hemoglobin (hemoglobinopathy), nhiễm HIV hoặc các trường hợp bị ức chế miễn dịch (immunosuppression), bị khối u (neoplasm) hay bị bệnh dạ dày ruột mạn tính. Trong trường hợp này sử dụng ampicillin, amoxicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, cefotaxime và ceftriaxone là những kháng sinh hiệu quả để điều trị.

Chloramphenicol là kháng sinh lựa chọn cho điều trị sốt thương hàn, chất này đã đưa vào sử dụng vào năm 1948. Chloramphenicol hoạt động bằng cách liên kết với tiểu đơn vị 50S ribosome của vi khuẩn và ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn và ức chế sự tổng hợp protein. Do chi phí thấp, đối với các chủng *S. Typhi* nhạy cảm, nên chloramphenicol vẫn còn được sử dụng để điều trị sốt thương hàn.

Điều đáng lưu ý là *S. Typhi* kháng được chloramphenicol: gây dịch bộc phát làm tỷ lệ người mắc phải chết cao xảy ra ở Mexico vào năm 1972, lan ra Bắc Mỹ và Châu Âu. Ở Ấn Độ dịch bộc phát do các chủng *S. Typhi* đa kháng xuất hiện đầu tiên ở Calicut (Kerala) vào năm 1972. *S. Typhi* đa kháng kháng cả streptomycin, sulfadiazine và tetracycline.

Hiện nay nhóm kháng sinh fluoroquinolone như ciprofloxacin, pefloxacin, norfloxacin, ... và nhóm cephalosporin thế hệ thứ ba ví dụ như ceftazidime, ceftriaxone, cefotaxime là những kháng sinh lựa chọn để điều trị *S. Typhi* đa kháng thuốc. Các kháng sinh này ngày càng được sử dụng gia tăng cho sốt thương hàn nhờ hiệu năng của chúng và làm người tái phát cũng như tỷ lệ người mang khuẩn thấp khi sử dụng kháng sinh này.

Cefotaxime ngăn chặn sự tổng hợp thành tế bào, ức chế vi khuẩn tăng trưởng. Trong thử nghiệm *in vitro*, kháng sinh này cho thấy hoạt tính tiêu diệt tuyệt vời với *S. Typhi* và các salmonellae khác và có hiệu năng chấp nhận trong sốt thương hàn. Các nghiên cứu gần đây cho thấy *Salmonella* kháng được ceftriaxone. Thời gian điều trị bệnh do *S. Typhi* sử dụng chloramphenicol, ampicillin hay trimethoprim và sulfamethoxazole là 14 ngày.

51.8. Phòng ngừa và kiểm soát

51.8.1. Phòng ngừa tổng thể

Sử dụng nước sạch, thực phẩm được chế biến hợp vệ sinh và sinh hoạt trong điều kiện vệ sinh sẽ làm giảm đáng kể tỷ lệ mắc phải sốt thương hàn ở các quốc gia có dịch cục bộ. Các biện pháp này không những chỉ làm giảm tỷ lệ mắc phải sốt thương hàn mà còn làm giảm bệnh đường ruột, là nguyên nhân chính gây ra tỷ lệ bệnh và tỷ lệ chết ở các quốc gia này.

Ngăn chặn ô nhiễm thực phẩm tại nhiều cấp độ khác nhau, ngăn chặn nhiễm tự nhiên từ động vật hay chim. Trong chăn nuôi, nuôi trồng ngăn chặn bằng cách áp dụng Quy phạm thực hành nuôi trồng tốt (GAP), trong sản xuất ngăn chặn bằng cách áp dụng Quy phạm thực hành tốt (GMP), Quy phạm vệ sinh và kiểm soát vệ sinh (SSOP) và chương trình quản lý chất lượng theo cách phân tích và kiểm soát mối nguy tại điểm kiểm soát tới hạn (CCP). Trong sử dụng cần phải nấu chín trước khi ăn và tránh tái nhiễm khi chuẩn bị thực phẩm sử dụng.

51.8.2. Tiêm chủng

Tiêm chủng bằng vaccine thương hàn cũng được xem là làm giảm tỷ lệ mắc phải bệnh thương hàn do *Salmonella*. Tiêm chủng vaccine sốt thương hàn thường xuyên dùng cho (i) người phơi nhiễm do tiếp xúc gần ví dụ các thành viên sống trong gia đình bị bệnh do *S. Typhi* hay người mang khuẩn; (ii) những người di chuyển đến các quốc gia có nguy cơ phơi nhiễm với *S. Typhi*; và (iii) người làm việc phòng thí nghiệm vi sinh vật học tiếp xúc với *S. Typhi*. Hai loại vaccine sốt thương hàn có tế bào vi khuẩn chết và vaccine được sử dụng qua đường miệng như sau:

(1). Vaccine có vi khuẩn tế bào chết

(a). Vaccine TAB: vaccine TAB là vaccine tế bào đã được làm chết chứa tế bào *S.*

Typhi tiêu diệt bằng nhiệt và được bảo quản trong 0,5% phenol, 1000 triệu tế bào /mL và *S. Paratyphi A* và *B*, 750 triệu/mL. Vaccine này được sử dụng trong nhiều năm ở Ấn Độ và những quốc gia khác xảy ra dịch thương hàn địa phương. Vaccine này sử dụng hai liều dưới da, mỗi liều 0,5 mL cách nhau 4 - 6 tuần, liều nhắc lại mỗi 3 năm. Đối với sốt thương hàn, thử nghiệm thực tế cho thấy hiệu năng tổng của vaccine này là 70 - 90% trong thời gian là 3 - 7 năm. Sốt và đau tại vị trí tiêm là những tác dụng phụ.

(b). Vaccine là kháng nguyên capsule polysaccharide Vi (ViCPS): vaccine kháng nguyên ViCPS được điều chế từ từ kháng nguyên Vi tinh sạch, capsule polysaccharide do *S. Typhi* sản sinh ra được phân lập từ nuôi cấy máu. Tiêm chủng ban đầu sử dụng vaccine ViCPS ngoài ruột liều đơn 0,5 mL (25 µg IM). Liều nhắc lại cần thực hiện sau mỗi 2 năm để duy trì sự bảo vệ, nếu có phơi nhiễm tiếp tục hay phơi nhiễm mới với *S. Typhi*. Hai thử nghiệm trên quy mô rộng cho thấy tỷ lệ bảo vệ là 50 - 64% ở Nam Phi và 72% ở Nepal, các khu vực này có bệnh do *S. Typhi* lan rộng. Sốt, đau đầu, ban đỏ (erythema) và co cứng là một số tác dụng phụ. Vaccine không nên sử dụng cho trẻ dưới 2 tuổi.

(c). Vaccine ngoài ruột bất hoạt bằng acetone: vaccine này hiện có sẵn ở Hoa Kỳ chỉ sử dụng cho quân đội. Vaccine này có hiệu năng là 75 - 94%. Liều nhắc lại sau 3 năm, nếu có phơi nhiễm tiếp tục hoặc phơi nhiễm mới.

(2). Vaccine uống

(a). Vaccine uống ty21a: đây là vaccine có chủng *S. Typhi* Ty21a sống đã được làm yếu chứa trong viên nang (nhộng) tan trong ruột. Chủng *S. Typhi* Ty21a là thể đột biến bền vững, thiếu enzyme UDPgalactose- 4-epimerase. Khi nuốt vào chủng này bắt đầu xâm nhiễm nhưng sau bốn đến năm lần phân đôi tế bào chúng sẽ tự phá hủy, vì vậy chúng không có khả năng gây bệnh. Mặc dù cơ chế chưa được hiểu rõ nhưng vaccine này làm kích thích các phản ứng của cả huyết thanh và kháng thể đường ruột cũng như miễn dịch qua trung gian tế bào (CMI).

Sử dụng vaccine Ty21a lần đầu gồm uống một viên tan trong ruột, uống xen kẽ nhau một số ngày sau đó uống tổng số là bốn viên. Liều nhắc lại cần thiết sau mỗi 5 năm để duy trì sự bảo vệ. Các viên nhộng chứa vi khuẩn cần bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C và cần tiến

hành tất cả 4 liều để đạt được hiệu quả cao nhất.

Đau bụng, buồn nôn, nôn mửa, sốt, đau đầu và ban đỏ (rash) hay chứng mào đay (urticaria) là những phản ứng phụ hiếm gặp sau khi sử dụng vaccin. Trong thử nghiệm ở Chi lê, kết quả thu được cho thấy tỷ lệ mắc phải sốt thương hàn giảm đáng kể ở những người tiêm bốn liều so với tiêm hai liều ($P < 0.001$) hay ba liều ($P = 0.002$). Tuy nhiên tỷ lệ này chỉ đạt 42% ở Indonesia, điều này được cho là vaccine này có thể không hiệu quả ở những khu vực phơi nhiễm với *S. Typhi* ở cường độ cao. Vaccine này không được khuyến cáo sử dụng cho những người bị suy giảm miễn dịch gồm những người bị HIV và trẻ dưới 6 tuổi.