

Chương 59. Vibrio

Mục lục

Chương 59. Vibrio.....	1
59.1. Giới thiệu	2
59.2. <i>Vibrio cholerae</i>	3
59.2.1. Đặc điểm sinh học	3
59.2.2. Đặc điểm gây bệnh.....	10
59.2.3. Dịch tễ học	15
59.2.4. Phát hiện tại phòng thí nghiệm.....	18
59.2.5. Điều trị.....	23
59.2.6. Phòng ngừa và kiểm soát	23
59.3. <i>Vibrio non-cholera</i>	24
59.3.1. <i>Vibrio mimicus</i>	25
59.3.2. <i>Vibrio</i> ưa mặn.....	25
59.3.3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25
59.4. Các loài <i>Vibrio</i> khác	34

59.1. Giới thiệu

Giống Vibrio gồm các thành viên hiếu khí và kỵ khí tùy nghi, có enzyme catalase và oxidase. Vi khuẩn thuộc họ này có khả năng khử nitrate thành nitrite và có thể tăng trưởng trên môi trường dinh dưỡng bình thường.

Bảng 59.1. Đặc điểm sinh hóa của các loài Vibrio gây bệnh thường gặp ở người.

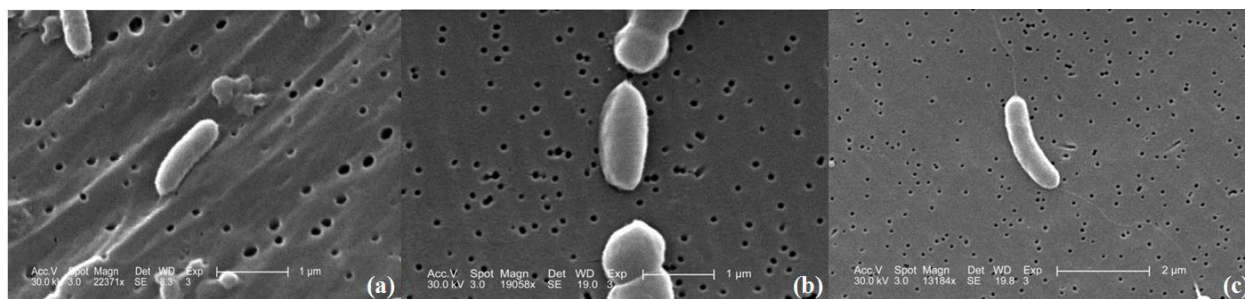
Đặc điểm	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.cholerae</i>	<i>V.fluvialis</i>	<i>V.furnissii</i>	<i>V.hollisae</i>	<i>V.metschnikovii</i>	<i>V.mimicus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>
TCBS agar	Y	Y	Y	Y	NG	Y	G	G	G
mCPC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y
CC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y
AGS	KA	Ka	KK	KK	Ka	KK	KA	KA	KA
Oxidase	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	-	-	-	+	+	+	+
0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Tăng trưởng ở:									
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	-	+	+	+	+	-	+	+
8% NaCl	+	-	V	+	-	V	-	+	-
10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tăng trưởng ở 42°C	+	+	V	-	nd	V	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Acid từ:									
D-Cellobiose	-	-	+	-	-	-	-	V	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Arabinose	-	-	+	+	+	-	-	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	V
ONPG	-	+	+	+	-	+	+	-	+
Voges-Proskauer	+	V	-	-	-	+	-	-	-
Nhạy cảm với:									
10 µg O/129	R	S	R	R	nd	S	S	R	S
150 µg O/129	S	S	S	S	nd	S	S	S	S
Gelatinase	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	V	-

Ghi chú: TCBS-thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose; mCPC, modified cellobiose-polymyxin B-colistin; AGS, arginine-glucose slant; Y = màu vàng; NG = không hoặc tăng trưởng kém; S = nhạy cảm; nd = không tiến hành; G = màu xanh lá cây; V = dao động giữa các chủng; R = kháng được; P = màu tía, V = dao động; KK = kiểm ở phần thạch nghiêng / kiểm ở phần thạch đứng; KA = kiểm ở phần thạch nghiêng/ acid ở phần thạch đứng, Ka = kiểm ở phần thạch nghiêng/acid nhẹ ở phần thạch đứng. Nguồn: BAM, FDA.

Tên vibrio có nguồn gốc từ đặc điểm di động rung của chúng, theo đó từ *vibrare* có nghĩa là rung. Các loài vibrio là trực khuẩn hình cong, Gram âm, có phản ứng oxidase dương. Khuẩn này di động nhờ tiên mao đỉnh. Chúng là những vi khuẩn không sinh bào tử và không tạo capsule. Vibrio sống tự nhiên trong nước biển nhưng chúng cũng được phát hiện ở nước ngọt khắp nơi trên thế giới.

Ít nhất có 33 loài trực khuẩn dạng cong thuộc Giống *Vibrio*, trong số này có khoảng 12 loài có khả năng gây bệnh cho người. Bảng 59.1 mô tả các đặc điểm khác

nhau của các loài thường gây bệnh cho người do tiêu thụ thực phẩm thủy sản.



Hình 59.1. Ảnh Vibrio dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM): (a) *Vibrio cholerae* (22371x), (b) *Vibrio parahaemolyticus* 19058x và (c) *Vibrio vulnificus* (13184x), thấy rõ tiên mao đỉnh (nguồn CDC).

Trong đó *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio vulnificus* là những loài nổi trội nhất gây bệnh cho người (Hình 59.1). Chi tiết bệnh do các loài gây ra ở người được tóm tắt ở Bảng 59.2.

Bảng 59.2. Bệnh ở người do các loài *Vibrio* gây ra.

Vi khuẩn	Bệnh
<i>Vibrio cholerae</i>	Tiêu chảy
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Viêm dạ dày ruột và nhiễm trùng vết thương
<i>Vibrio vulnificus</i>	Viêm dạ dày ruột và nhiễm trùng vết thương
<i>Vibrio hollisae</i>	Viêm dạ dày ruột và nhiễm trùng vết thương
<i>Vibrio mimicus</i>	Viêm dạ dày ruột và nhiễm trùng vết thương
<i>Vibrio metschnikovii</i>	Du khuẩn huyết (bacteremia)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Nhiễm trùng vết thương và viêm tai ngoài

59.2. *Vibrio cholerae*

V. cholerae là loài quan trọng nhất gây bệnh tả, bệnh dịch tiêu chảy. Mất nước và gây chết có thể xảy ra nhanh chóng trong một vài giờ sau khi bị xâm nhiễm.

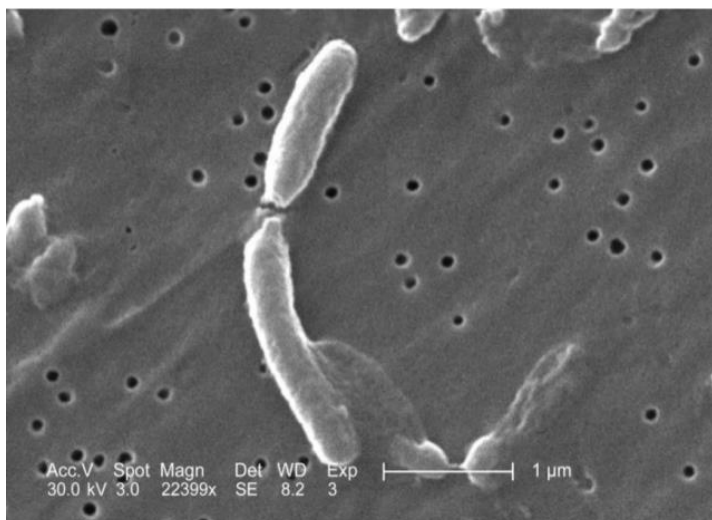
59.2.1. Đặc điểm sinh học

59.2.1.1. Hình thái

V. cholerae tăng trưởng tốt nhất trong điều kiện hiếu khí, ngược lại chúng tăng trưởng chậm trong điều kiện kỵ khí. Khuẩn này tăng trưởng trong khoảng nhiệt độ từ 16 -

40°C, tối thích ở 37°C. Khuẩn này cũng tăng trưởng tốt hơn trong môi trường kiềm có khoảng pH từ 7,4 - 9,6, tối thích ở 8,2. *V. cholerae* tăng trưởng tối thích trong môi trường có hàm lượng muối sodium chloride từ 0,5 - 1%, nhưng khi ở nồng độ muối cao $\geq 5\%$, sự tăng trưởng của chúng sẽ bị ức chế. Khác với các vi khuẩn ưa mặn khác, *V. cholerae* có thể tăng trưởng trong môi trường không có muối.

V. cholerae là trực khuẩn Gram âm có hai đầu tròn hoặc nhọn tương đối. Kích thước dài 1 - 3 μm và rộng 0,5 - 0,8 μm . Khuẩn này có dạng hình phẩy điển hình (Hình 59.2 và 59.3). Dạng hình chữ S hay dạng xoắn cũng có thể là do hai hoặc nhiều tế bào có các đầu cuối nằm lên nhau. Các chủng nuôi cấy già hơn thường có dạng đa hình. Khi nhuộm niêm dịch từ trường hợp bị nhiễm cholera, vibrio thường xếp thành các dãy song song với nhau. Đặc điểm này được Koch mô tả giống như là hình ảnh "cá bơi theo dòng".



Khuẩn này di động tích cực nhờ một tiên mao ở đỉnh. *V. cholerae* không tạo bào tử và không bị acid fast (non-acid fast).

Hình 59.2. Hình ảnh *Vibrio cholerae* O1 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) độ phóng đại 22399x, cho thấy hai tế bào đã phân tách nhờ quá trình phân đôi

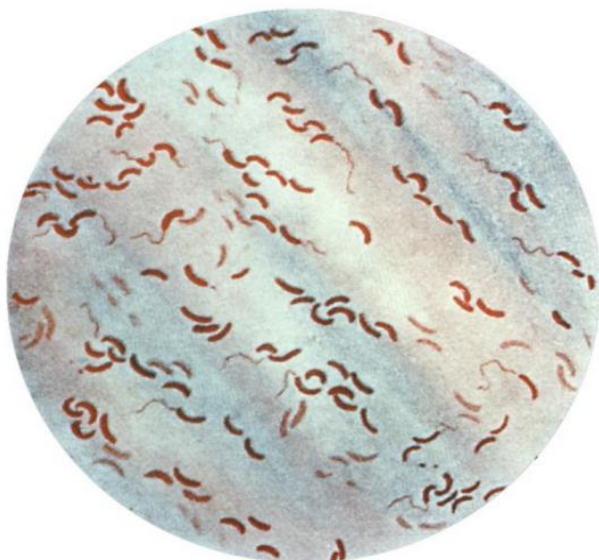
tế bào (CDC).

59.2.1.2. Nuôi cấy

V. cholerae tăng trưởng tốt trong nhiều môi trường gồm môi trường không chọn lọc như: môi trường thạch dinh dưỡng, thạch MacConkey, thạch máu, thạch gelatin và nước peptone. Chúng cũng tăng trưởng trên các môi trường đặc biệt như môi trường vận chuyển, môi trường tăng sinh và các môi trường chọn lọc.

(1). Môi trường không chọn lọc: *V. cholerae* trên môi trường thạch dinh dưỡng ủ qua đêm, khuẩn lạc của chúng ẩm trong suốt, nhuộm màu xanh lơ, có đường kính từ 1 - 2 mm. Khuẩn lạc của chúng phát ra mùi đặc biệt. *V. cholerae* tạo khuẩn lạc trên môi

trường thạch MacConkey thường không màu sau khi ủ qua đêm nhưng sẽ trở nên có màu đỏ nhạt khi ủ kéo dài do lên men chậm lactose. Kiểu sinh học Eltor của *V. cholerae* sẽ hình thành khuẩn lạc tiêu huyết trên môi trường thạch máu. Tuy nhiên các chủng có kiểu sinh học Cổ điển (Classical) sẽ hình thành khuẩn lạc có màu xanh nhạt xung quanh khuẩn lạc, sau đó sẽ trở nên trong do tiêu huyết. Trên môi trường thạch gelatin, sự phân giải của *V. cholerae* làm gelatin hoá lỏng sẽ tạo thành dạng hình phễu hoặc hay dạng củ cải sau khi ủ 3 ngày ở 22°C. Trong nước peptone, khuẩn này tăng trưởng hình thành bề mặt mỏng manh, mịn sau khi ủ 6 - 9 giờ.



Hình 59.3. Hình ảnh nhuộm Gram của vi khuẩn *V. cholerae* gây bệnh tiêu chảy, thấy được cả tiên mao (CDC).

(2). Môi trường vận chuyển: môi trường Venkatraman–Ramakrishnan (VR) và Cary–Blair là hai môi trường thường được sử dụng làm môi trường vận chuyển các mẫu phân hoặc được phòng thí nghiệm sử dụng để lưu giữ mẫu cho phân tích sau.

Môi trường vận chuyển giúp duy trì cho

các tế bào *V. cholerae* còn sống và ngăn chặn sự ức chế từ hệ vi khuẩn bình thường trong tuyến tiêu hoá có trong mẫu phân.

(a). Môi trường VR: đây là môi trường lỏng có 20 g muối biển thô và 5 g peptone hoà tan trong 1L nước cất, pH từ 8,6 - 8,8. Phân phối 10 - 15 mL môi trường này vào chai có nắp vặn để vận chuyển 1 - 3 mL mẫu.

(b). Môi trường Cary–Blair: đây là môi trường rắn, gồm dung dịch đậm sodium chloride, sodium thioglycollate, disodium hydrogen phosphate, calcium chloride và agar, pH 8. Môi trường này phù hợp để vận chuyển *Vibrio* spp. cũng như *Salmonella* và *Shigella* spp.

(3). Môi trường tăng sinh: môi trường tăng sinh *V. cholerae* là môi trường lỏng có pH cao. pH cao của môi trường là yếu tố để ức chế sự tăng trưởng của các vi khuẩn

hội sinh trong đường ruột nhưng lại thích hợp cho *V. cholerae* tăng trưởng. Nước peptone kiềm (APW) và môi trường lỏng Monsur's taurocholate tellurite peptone là hai môi trường thường được sử dụng để tăng sinh *V. cholerae*.

(a). APW: thường được sử dụng làm môi trường tăng sinh các mẫu có yêu cầu phân tích Vibrio. Môi trường này có pH 8,6. Cho một lượng mẫu theo tỷ lệ 1: 10 vào môi trường, ủ ở 37°C trong 3 - 6 giờ hoặc ủ qua đêm ở 37°C hoặc 41°C nếu là mẫu thực phẩm sau đó phân lập trên môi trường chọn lọc.

(b). Môi trường lỏng Monsur's taurocholate tellurite peptone: là môi trường chọn lọc hơn cho *V. cholerae*. pH của môi trường này là 9,0. Mẫu được cho vào môi trường theo tỷ lệ 1: 10, sau đó ủ ở 37°C trong 3 - 6 giờ hoặc ủ qua đêm nếu là mẫu thực phẩm sau đó phân lập trên môi trường chọn lọc.

(4). Môi trường chọn lọc: môi trường chọn lọc thường được sử dụng để phân lập các Vibrio gồm (a) thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS), (b) Monsur's gelatin taurocholate trypticase tellurite (GTТА) agar và (c) alkaline bile salt agar (BSA). Tất cả ba môi trường này đều có pH nhằm ức chế các vi khuẩn đường ruột khác nhưng lại thích hợp cho vibrio tăng trưởng.

(a). Môi trường TCBS (pH 8,6): môi trường này có thiosulfate, citrate, muối mật, sucrose, và chất chỉ thị xanh bromothymol. Trên môi trường này *V. cholerae* hình thành khuẩn lạc lớn, lồi và có màu vàng do vi khuẩn lên men sucrose tạo acid. Sự tích lũy acid trong môi trường làm pH giảm vì vậy làm cho chỉ thị màu xanh bromothymol chuyển sang vàng, nên làm cho khuẩn lạc *V. cholerae* có màu vàng. *V. parahaemolyticus* không lên men đường sucrose nên có màu xanh.

(b). Môi trường Monsur's GTТА (pH 8,5): pH cao và potassium tellurite có trong môi trường ức chế hầu hết các vi khuẩn Gram dương ngoại trừ các loài *Proteus*. Vì vậy môi trường này được sử dụng để phân lập *V. cholerae* và các vi khuẩn khác có trong phân. Sau 24 giờ ủ, *V. cholerae* tạo khuẩn lạc nhỏ, trong suốt, có tâm đen xám và có vòng đục bao xung quanh khuẩn lạc. Khuẩn lạc sẽ lớn hơn, từ 3 - 4 mm sau khi ủ kéo dài trong 48.

(c). Môi trường BSA kiềm (pH 8,2): đây là môi trường chọn lọc khác được sử

dụng cho *V. cholerae*. Khuẩn lạc trên môi trường này tương tự như khuẩn lạc trên môi trường thạch dinh dưỡng.

59.2.1.3. Phản ứng sinh hoá

V. cholerae có catalase và oxidase dương, lên men đường tạo acid không sinh hơi. Khuẩn này lên men glucose, sucrose, maltose, mannitol và mannose. Nó lên men chậm lactose khi ủ thêm một vài ngày. Chúng không lên men được arabinose, inositol và dulcitol. Sinh indole và khử nitrate thành nitrite. Khuẩn này có methyl red dương và urea âm. *V. cholerae* hoá lỏng được gelatin và khử nhóm decarboxyl của lysine và ornithine nhưng đối với arginine thì không.

V. cholerae có phản ứng cholera đỏ bằng cách cho một vài giọt acid sulfuric và dung dịch peptone có cấy vi khuẩn được ủ ở 37°C trong 24 giờ, tạo ra màu hồng đỏ trong dung dịch peptone do hình thành nitroso indole. Hai đặc điểm hình thành indole và khử nitrate thành nitrite là các phản ứng chính hình thành phản ứng cholera đỏ.

Bảng 59.3. Đặc điểm khác biệt của các kiểu sinh học thuộc *Vibrio cholerae*.

Đặc tính	Kiểu sinh học của <i>Vibrio cholerae</i>	
	Kiểu Cổ điển	Kiểu Eltor
Tiêu huyết cừu trên môi trường RBCs	-	+
Ngưng kết hồng cầu của gà	-	+
Thử nghiệm Voges–Proskauer	-	+
Nhạy cảm với polymixin B	+	-
Nhạy cảm với:		
Mukerjee nhóm IV	+	-
Eltor Phage 5	-	+
Yếu tố ức chế vibrio (O/129)	+	-

Các kiểu sinh học Cổ điển và Eltor của *V. cholerae* có phản ứng Voges–Proskauer dao động, có khả năng tiêu huyết cừu trên RBCs và ngưng kết hồng cầu của gà trên RBCs. Sự khác biệt giữa các kiểu sinh học Cổ điển và Eltor của *V. cholerae* được tóm tắt ở Bảng 59.3.

59.2.1.4. Các đặc điểm khác

V. cholerae rất nhạy cảm với nhiệt, làm khô, acid và các chất khử trùng phổ biến khác. *V. cholerae* bị tiêu diệt ở 56°C trong 30 phút, bị tiêu diệt trong một vài phút trong dịch dạ dày. Nhưng khuẩn này có khả năng kháng kiềm cao. Chúng vẫn có thể sống sót 1 - 2 tuần trong nước biển sạch, 30 ngày trong nước máy, 1 - 5 ngày trong trái cây ở nhiệt độ phòng và 1 tuần trong tủ lạnh. Tuy nhiên, vibrio không thể sống sót lâu hơn trong nước bị ô nhiễm nặng. Chúng có thể sống sót vài ngày trong chất thải của người chưa qua xử lý.

Trong thực nghiệm trên pha muối, *V. cholerae* có thể tăng trưởng ở thế nước (A_w) thấp nhất là 0,9, phần trăm nước cao nhất trong pha muối là 6. Khuẩn này tăng trưởng trong khoảng pH từ 5 - 10, khoảng nhiệt độ tăng trưởng là 10 - 43°C.

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

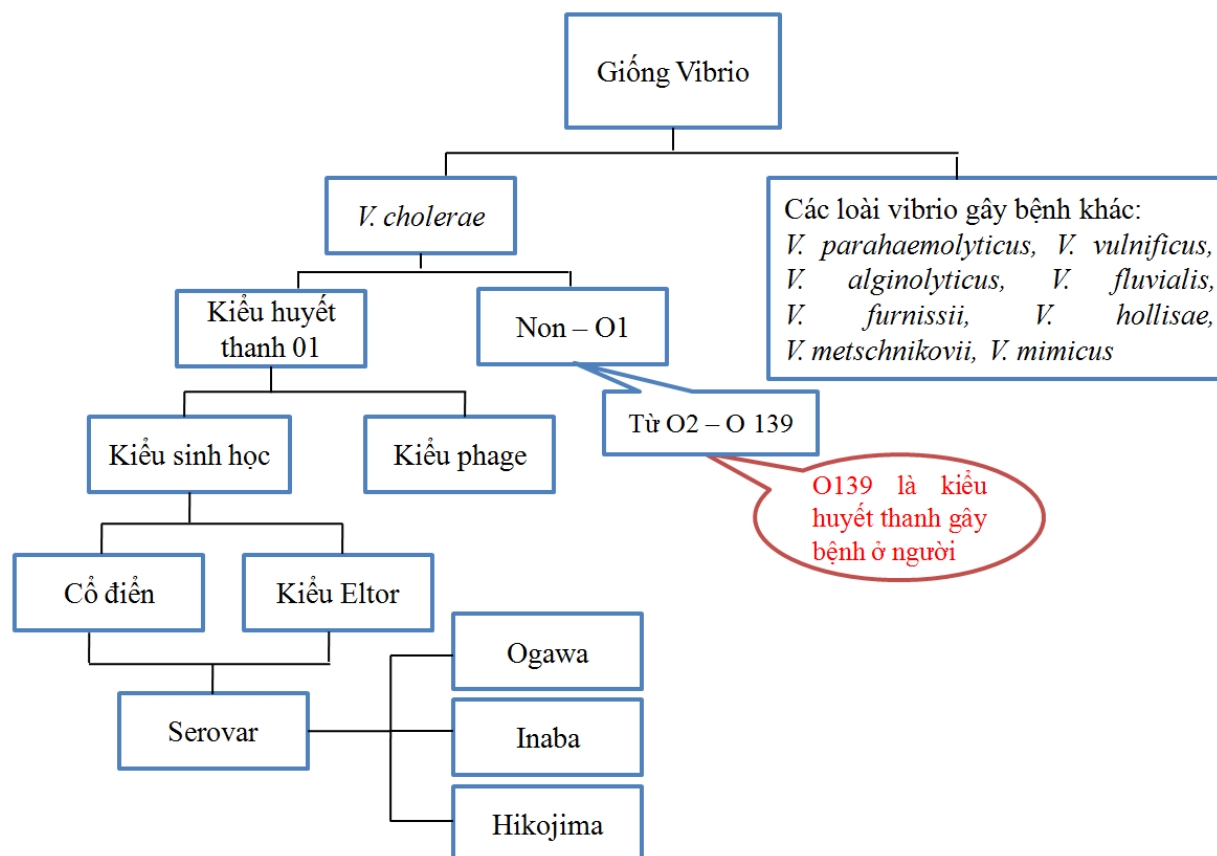
Thành tế bào *V. cholerae* giống như các trực khuẩn Gram âm khác có lipopolysaccharide (LPS). LPS không có vai trò trong sự phát sinh bệnh tả nhưng lại có vai trò cho sự miễn dịch để tạo ra vaccine tiêu diệt *V. cholerae*. *V. cholerae* có hai kháng nguyên đó là: (a) kháng nguyên thân hay kháng nguyên O có trong thành tế bào vi khuẩn. Kháng nguyên O là nhóm kháng nguyên đặc trưng. (b) Kháng nguyên tiên mao hay kháng nguyên H là kháng nguyên không bền nhiệt có trong tiên mao và tất cả các chủng *V. cholerae* cùng có kháng nguyên này.

59.2.1.6. Phân kiểu huyết thanh

Năm 1935, Gardner và Venkatraman đã đưa ra cách phân loại *V. cholerae* dựa trên huyết thanh. Theo đó căn cứ trên carbohydrate của kháng nguyên thân O, *V. cholerae* được phân thành nhiều kiểu huyết thanh (serotype). Hiện nay có hơn 200 kiểu huyết thanh đã được mô tả, chúng được phân thành hai nhóm phổ rộng chính đó là *V. cholerae* O1 và *V. cholerae* không phải O1 (non-O1), cụ thể như sau:

V. cholerae O1 ngưng kết với các huyết thanh kháng đối với nhóm O1 và được gọi là vibrio tả (cholera) hay vibrio ngưng kết. *V. cholerae* O1 được chia thành hai kiểu sinh học: kiểu Eltor và kiểu Cổ điển, Việc phân chia này được dựa trên các tiêu chí về sinh hoá của chúng. Mỗi kiểu sinh học được chia thành ba kiểu phụ đó là: Ogawa, Inaba và Hikojima (Bảng 59.4). Việc phân loại này dựa trên sự khác nhau trong các kháng nguyên

O như A, B, C. Kiểu huyết thanh Ogawa có kháng nguyên A và B, Inaba có kháng nguyên A và C và Hikojima có tất cả ba kháng nguyên A, B và C. Vì vậy các chủng Hikojima ngưng kết với cả hai kháng huyết thanh Ogawa và Inaba, ngược lại các chủng Ogawa và Inaba chỉ ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu của chúng.



Hình 59.4. Sơ đồ minh họa phân loại giống Vibrio.

V. cholerae non-O1 không ngưng kết với nhóm kháng huyết thanh O1, nên được gọi là vibrio không phải cholera (non-cholera vibrio) hay vibrio không ngưng kết. Vibrio không phải cholera được phân thành 138 kiểu huyết thanh được ấn định từ O2 đến O139. Trong số các kiểu huyết thanh này chỉ có *V. cholerae* O139 gây bệnh tả ở người. Các kiểu huyết thanh còn lại từ O2 - O138 thì không gây bất kỳ bệnh nào cho người (Hình 59.4).

Mặc dù hiếm khi bắt gặp được kiểu Cổ điển, nhưng sự khác nhau giữa kiểu sinh học El Tor và kiểu Cổ điển có thể phân biệt được nhờ thử nghiệm sinh hóa sau đây:

(a). **Tiêu huyết beta**, đây là phản ứng phổ biến nhất, dễ quan sát nhất để phân biệt khác nhau giữa các kiểu *V. cholerae* O1 đó là xác định tiêu huyết β trên thạch máu cừu. Chủng El Tor có tiêu huyết β , ngược lại các chủng cổ điển thì không tiêu huyết. Khi ủ các đĩa có cấy chủng thử nghiệm ở $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 18-24 giờ. Tiêu huyết beta có thể được xác định nhờ xuất hiện vòng trong xung quanh khuẩn lạc.

Bảng 59.4. Kiểu huyết thanh của *Vibrio cholera* O1.

Kiểu huyết thanh	Kháng nguyên O
Ogawa	A,B
Inaba	A,C
Hikojima	A,B,C

(b). **Nhạy cảm với polymyxin B**, khi cấy trải chủng nghi ngờ lên môi trường thạch khô T₁N₁, sau đó đặt đĩa giấy có 50 đơn vị polymyxin B lên bề mặt. Úp ngược đĩa ủ qua đêm ở $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Chủng Cổ điển nhạy cảm với polymyxin B, có vùng không mọc khuẩn >12 mm ngược lại chủng El Tor kháng được.

59.2.1.7. Phân kiểu phage

Kiểu sinh học Cổ điển của *V. cholerae* O1 được phân thành năm kiểu dựa trên bốn phage I, II, III và IV. Tất cả các pha này phân giải được kiểu sinh học Cổ điển nhưng các chủng Eltor thì không. Dựa trên bốn phage này và thể phage thứ năm, *V. cholerae* kiểu sinh học Eltor cũng được chia thành sáu kiểu.

59.2.1.8. Phân kiểu sinh học

Dựa trên sự lên men đường mannose, sucrose và arabinose, năm 1934 Heiberg đã chia các vibrio thành sáu nhóm là I, II, III, IV, V và VI; tiếp đến hai nhóm đã được thêm vào. *V. cholerae* thuộc nhóm I.

59.2.2. Đặc điểm gây bệnh

Bệnh tả là bệnh do độc tố gây ra. Độc tố tả cholera (CTx) do *V. cholerae* tạo ra là yếu tố gây độc chính của vi khuẩn.

59.2.2.1. Yếu tố gây độc

Yếu tố gây độc của *V. cholerae* gồm (a) độc tố tả (CT), (b) sợi tơ cùng điều hoà độc tố (TCP), (c) yếu tố dính (ACF), (d) protease ngưng kết hồng cầu (hap; mucinase),

(e) enzyme neuraminidase và (f) thể mang sắt. Hầu hết các yếu tố gây độc này được biểu hiện do các gen nằm trên nhiễm sắc thể của *V. cholerae* kiểm soát. Các gen này gồm gen CTx A và CTx B mã hoá cho độc tố tả, gen TCP mã hoá cho sợi tơ cùng điều hòa độc tố (TCP), ACF, gen hap và enzyme neuraminidase (Bảng 59.4).

(a). Độc tố tả: là yếu tố gây độc quan trọng nhất do *V. cholerae* tạo ra. Vùng gen gây bệnh được ấn định là VPI (vùng gen gây bệnh của vibrio), chứa hầu hết các gen cần thiết gây ra bệnh tả được chứng minh để điều hòa gen CT. Độc tố này còn được biết với tên là độc tố cholerae hay độc tố tả gây bệnh đường ruột. Nó là một độc tố không bền nhiệt, có trọng lượng phân tử 85.600 kDa và bị phá huỷ ở 56°C trong 30 phút. Độc tố tả có cấu trúc và chức năng tương tự như độc tố gây bệnh đường ruột không bền nhiệt của *Escherichia coli*. Cấu tạo của chúng gồm hai tiểu đơn vị A và B. Các gen CTx A và CTx B mã hoá cho tiểu đơn vị này của độc tố. Tiểu đơn vị A có trọng lượng phân tử 27,215 kDa và tiểu đơn vị B, mỗi tiểu đơn vị có trọng lượng phân tử là 11,677 kDa.

Tiểu đơn vị A gồm hai phân đoạn A1 và A2, chúng nối với nhau nhờ cầu nối cộng hóa trị disulfide đơn. Phân đoạn A1 đảm nhận vai trò hoạt tính sinh học của độc tố. Phân đoạn A2 có chức năng liên kết phân đoạn có hoạt tính A1 với tiểu đơn vị B.

Phân đoạn A1 kích thích adenosine monophosphate (cAMP) vòng liên kết với tế bào, chất này đến lượt chuyển ATP thành cAMP trong các tế bào biểu mô ruột. Độc tố tả có các chức năng sinh học sau:

- Ước chế khả năng hấp thu và hoạt hóa làm tiết chloride vận chuyển trong các tế bào hấp thu ở ruột (enterocyte), thậm chí làm mất sodium chloride trong lumen ruột. Độ thẩm thấu trong lumen ruột được giữ cân bằng nhờ tiết ra một lượng lớn nước, nước này sẽ trở nên quá mức khả năng hấp thu và dẫn đến gây tiêu chảy. Dịch tiêu chảy có đặc tính đẳng trương (isotonic) nhưng chứa nhiều potassium và bicarbonate.
- Độc tố tả cũng ức chế sự hấp thu sodium và chloride trong đường ruột.
- Độc tố tả cũng làm gia tăng tính thấm mao quản trên da. Nên cũng được gọi là yếu tố thấm. Yếu tố thấm này có thể được phát hiện bằng thử nghiệm chuyển màu xanh trên da. Trong thử nghiệm này, độc tố tả được tiêm vào dưới da thỏ hay chuột lang, tiếp theo tiêm vào tĩnh mạch chất nhuộm xanh Evans. Ở thử nghiệm dương tính, da tại vị

trí tiêm sẽ trở nên có màu xanh do gia tăng tính thấm mao quản.

Độc tố tả có thể được chứng minh bằng các thử nghiệm sau:

(1). Thử nghiệm vòng hồi tràng (ileal loop) ở thỏ là phương pháp cổ điển do De và Chatterjee phát triển vào năm 1952. Đây là phương pháp được sử dụng rộng rãi, theo đó chủng *V. cholerae* hay chủng qua lọc (culture filtrate) được tiêm vào trong vòng hồi tràng đã được thắt lại (ligated ileal loop) gây ra sự tích lũy dịch, làm cho vòng hồi tràng phồng lên.

(2). Thử nghiệm ELISA và thử nghiệm nhanh miễn dịch phát huỳnh quang RIF.

(3). Ước lượng hàm lượng cAMP có trong các tế bào khối u bằng cách xử lý với độc tố.

(4). Chứng minh những thay đổi mô học trong các tế bào khối u thượng thận (Y1), sự kéo dài của những tế bào biểu mô xuất phát từ buồng trứng của chuột hamster (tế bào oval ở chuột hamster - CHO) và sự hoạt hóa phân giải lipid trong mô tinh hoàn ở chuột.

Bảng 59.5. Yếu tố độc của *Vibrio cholerae*.

Yếu tố độc	Chức năng sinh học
Độc tố tả cholera	Độc tố này ức chế sự hấp thu sodium và chloride ở đường ruột; gây tiết quá mức một lượng lớn nước và chất điện giải. Hoạt hoá adenylate cyclase và sản sinh quá mức cAMP.
Sợi tơ cùng điều hoà độc tố (TCP)	Hỗ trợ cho <i>Vibrio cholerae</i> bám vào tế bào niêm mạc ruột
Yếu tố hỗ trợ sự tập kết	Hỗ trợ sự bám dính của vi khuẩn vào niêm mạc ruột
Protease ngưng kết hồng cầu (mucinase)	Cảm ứng viêm ruột và cũng hỗ trợ cho sự phóng thích các vibrio ra khỏi niêm dịch để vào lumen ruột
Neuraminidase	Gia tăng thụ thể độc tố cho <i>Vibrio cholerae</i>
Thể mang sắt	Đại phân tử này có chức năng cô lập sắt

(b). Sợi tơ cùng điều hoà độc tố (toxin coregulated pilus): sợi tơ giúp *V. cholerae* dính lên tế bào niêm mạc ruột.

(c). Yếu tố hỗ trợ sự tập kết/kết cụm: những yếu tố này giúp vi khuẩn dính lên niêm mạc ruột.

(d). Hemagglutination-protease (mucinase): protease ngưng kết hồng cầu hay còn gọi là hemagglutination-protease. Enzyme này trước đây được biết như là lectin tả (cholera lectin), nó là yếu tố ngưng kết (agglutinin) và là protease phụ thuộc vào kẽm. Enzyme này phân cắt niêm dịch và fibronectin cũng như tiểu đơn vị của độc tố tả. Nó cảm ứng gây viêm ruột và cũng giúp phóng thích các vibrio tự do bị bao trong niêm mạc để vào lumen ruột.

(e). Neuraminidase: enzyme phá hủy neuraminic acid, vì vậy làm tăng thụ thể độc tố đối với *V. cholerae*.

(f). Thể mang sắt: đại phân tử này có chức năng cô lập sắt.

59.2.2.2. Phát sinh bệnh tả

V. cholerae thường xâm nhập vào cơ thể qua thực phẩm, nước bị nhiễm. Acid dạ dày là rào cản phòng vệ đầu tiên của cơ thể chống lại sự xâm nhiễm của *V. cholerae*, do vibrio nhạy cảm cao với acid dạ dày. Các trường hợp làm giảm tính acid của dạ dày có pH > 5 sẽ làm cho động vật chủ nhạy cảm hơn với sự xâm nhiễm của *Vibrio cholerae*.

Khi tiếp cận được ruột non nhờ các cơ chế như di động, chemokine và sản sinh ra các enzyme như chất ngưng kết hồng cầu hemagglutinin và protease, *V. cholerae* sẽ tiếp cận được lớp niêm dịch của ruột non. Hemagglutinin và protease sẽ bẻ gãy mucin và fibronectin của niêm dịch. Tiếp đến là vi khuẩn này dính vào thành ruột nhờ sợi tơ TCP. Hoạt động đồng bộ của CTx, TCP và một số yếu tố gây độc khác được điều hòa bởi các sản phẩm gen Tox R, còn được gọi là bảng điều khiển.

Một khi các vibrio dính vào thành ruột sẽ sản sinh ra độc tố tả. Độc tố này hoạt hóa cAMP, chất này ức chế sự hấp thu sodium vận chuyển và hoạt hóa tiết chloride vận chuyển trong các tế bào biểu mô ruột. Điều này làm tích lũy sodium chloride trong lumen ruột. Tính thẩm thấu cao của dịch đường ruột được cân bằng bằng cách tiết ra một lượng lớn nước, lượng nước này vượt quá khả năng hấp thu của lumen, thậm chí gây tiêu chảy.

Chủng *V. cholerae* O139 biểu hiện cơ chế gây bệnh tương tự như *V. cholerae* O1, ngoại trừ chúng sản sinh ra LPS có kháng nguyên O139 và đặc tính miễn dịch có liên quan đến kháng nguyên O capsule. Hai yếu tố gây độc này giúp tăng cường tính gây độc của *V. cholerae* O139. Các yếu tố này có chức năng làm gia tăng khả năng khác của vi

khẩn đối với huyết thanh người trong *in vitro* và sự phát triển của du khuẩn huyết (bacteremia) thỉnh thoảng được phát hiện trong quá trình nhiễm khuẩn này.

59.2.2.3. Hội chứng lâm sàng

V. cholerae gây bệnh tả là một bệnh tiêu chảy cấp, bệnh này có thể gây chết nhanh nếu không điều trị nhanh chóng.

Bệnh tả có thời gian ủ bệnh ngắn và dao động từ 2 đến 3 ngày sau khi bị nhiễm vi khuẩn này. Bệnh có biểu hiện các triệu chứng bị tấn công bất ngờ như tiêu chảy ra nước và nôn mửa. Tiêu chảy ra nước xối xả là biểu hiện quan trọng nhất của bệnh tả. Lượng phân tiêu chảy được bài tiết ra nhiều hơn bệnh tiêu chảy do các yếu tố gây bệnh khác gây ra. Trong trường hợp nặng một ngày bệnh nhân có thể bài tiết ra 250 mL phân/kg trọng lượng cơ thể. Phân do tả gồm: (a) nhiều nước, không màu, không mùi, không có protein và có đốm nhỏ cùng với chất nhầy và thường được mô tả là phân trắng giống nước gạo; (b) có chứa một ít bạch cầu leukocyte, nhưng không có hồng cầu là bởi vì *V. cholerae* không kích thích bất kỳ phản ứng viêm nào ở niêm mạc ruột và (c) là dịch điện giải giàu bicarbonate, có chứa một ít protein.

Đau bụng nghiêm trọng, có lẽ là do sự sưng phồng ruột non gây ra do bài tiết một lượng lớn hơn dịch trong đường ruột được phát hiện ở bệnh nhân bị tả. Nôn mửa là biểu hiện quan trọng khác của bệnh tả và xuất hiện ở giai đoạn sớm của bệnh. Điều này là do tính cử động của dạ dày và ruột bị giảm gây ra.

Nếu bệnh nhân tả không được điều trị, có thể làm mất nước và chất điện giải nghiêm trọng do tiêu chảy và nôn mửa. Điều này có thể làm mất nước đẳng trương (isotonic dehydration), nhiễm acid chuyển hóa (metabolic acidosis), giảm kali huyết (hypokalemia) và sốc do giảm dung lượng máu (hypovolemic shock).

Mất nước ở bệnh nhân tả diễn ra rất nhanh, trong vòng vài giờ sau khi triệu chứng tấn công. Đặc điểm này không được phát hiện ở các bệnh tiêu chảy do các vi sinh vật gây bệnh khác gây ra. Ở những bệnh nhân bị bệnh nghiêm trọng, tiêu chảy dẫn đến làm sa mạch (vascular prolapse) và sốc, bệnh nhân có thể chết do rối loạn nhịp tim (cardiac arrhythmia) và thận hư (renal failure). Các biến chứng khác gồm mất cân bằng điện giải và giảm glucose huyết (hypoglycemia).

Ở những bệnh nhân không được điều trị, tỷ lệ tử vong mắc phải ước tính dao động từ 25% đến 50%. Ở những bệnh nhân được điều trị tích cực bằng việc thay thế dịch và chất điện giải đã mất thì tỷ suất chết mắc phải nhỏ hơn 1%.

V. cholerae O139 gây ra tả, bệnh có thể nghiêm trọng như bệnh do *V. cholerae* O1 gây ra. *V. cholerae* O139 đôi khi có thể gây bệnh xâm nhiễm gây ra du khuẩn huyết.

59.2.2.4. Miễn dịch của cơ thể chủ

Sự miễn dịch về bệnh tả có thể được tạo ra nhằm chống lại độc tố tả hay vi khuẩn. Sự xâm nhiễm tự nhiên của bệnh tả cảm ứng một vài mức độ miễn dịch trong giai đoạn 6 - 12 tháng. Sự tái nhiễm sẽ xảy ra đối với người đó sau giai đoạn này. Biện pháp tiêm chủng bằng vaccine khuẩn tả đã chết sẽ bảo vệ cơ thể trong thời gian ngắn. Vaccine sống qua đường miệng sẽ cảm ứng miễn dịch cục bộ bằng cách tiết ra kháng thể IgA trong đường ruột. Sự miễn dịch này được cảm ứng bằng vaccine uống cũng đem lại hiệu quả trong thời gian ngắn. Nhiễm khuẩn *V. cholerae* kiểu sinh học Cổ điển thường bảo vệ chống lại bệnh xâm nhiễm do *V. cholerae* kiểu sinh học Cổ điển cũng như các chủng Eltor. Nhưng ngược lại nhiễm khuẩn *V. cholerae* kiểu sinh học Eltor gây ra thì không được bảo vệ chống lại kiểu sinh học Cổ điển.

59.2.3. Dịch tễ học

V. cholerae được phát hiện trong môi trường tự nhiên ở vùng cửa sông và biển khắp nơi trên thế giới

59.2.3.1. Phân bố về địa lý

Bệnh tả tiếp tục là một vấn đề lớn về sức khỏe cộng đồng ở nhiều quốc gia trên thế giới. Trong nhiều thập kỷ qua bệnh này hiếm khi xuất hiện ở các nước phát triển. Năm 2004, có đến 101.338 trường hợp mắc bệnh tả và 2.345 ca chết từ 56 quốc gia trên thế giới. Phần lớn các trường hợp được báo cáo từ các nước Châu Phi và Châu Á. Bệnh tả xảy ra như là bệnh dịch địa phương, dịch bộc phát và dịch bùng phát.

Bệnh nhân tả và người phục hồi tiết ra một lượng lớn *V. cholerae* O1 theo đường phân. Bệnh được lan truyền chủ yếu qua đường phân - miệng, gián tiếp qua nguồn nước cấp bị ô nhiễm. Lây lan trực tiếp từ người sang người thì không phổ biến. Nguồn thực phẩm có thể bị nhiễm do sử dụng phân người làm phân bón hoặc rau tươi bán ngoài chợ

sử dụng nguồn nước bị nhiễm. Việc bùng nổ bệnh tả là do tiêu thụ thủy sản bị nhiễm, thủy sản sống, thủy sản chưa nấu chín, hoặc thủy sản bị tái nhiễm hoặc rau sống bị nhiễm.

Bùng phát dịch tả: trong thế kỷ 19 có sáu đợt bùng phát dịch tả xảy ra, tác động đến Châu Âu và Hoa Kỳ, làm hơn 115.000 trường hợp chết vào năm 1832 và 50.000 ca chết vào năm 1856. Trong thế kỷ 20 có bảy đợt bùng phát dịch tả bắt đầu vào năm 1961 và ảnh hưởng đến 5 lục địa vào năm 1991. Không giống như sáu đợt bùng phát dịch trước đây do *V. cholerae* kiểu sinh học Cổ điển gây ra, đợt bùng phát dịch lần thứ bảy này là do *V. cholerae* có kiểu sinh học Eltor gây ra. Các đợt dịch bùng phát có nguồn gốc ở Châu Á vào những năm của thập niên 1960, đến Châu Phi vào những năm đầu của thập niên 1970 làm gây bùng phát dịch tả. Năm 1991 dịch bùng phát nổ ra ở Peru và kế tiếp lan nhanh qua nhiều quốc gia của Nam và Trung Mỹ cũng như Hoa Kỳ và Canada. Vào giữa năm 1995, tại Hoa Kỳ có hơn 1 triệu ca mắc bệnh và làm 10.000 trường hợp chết do bệnh này. Vụ bùng phát dịch tả lần thứ bảy thì khác với các vụ bùng phát dịch tả trước đó theo các cách như sau:

(1). Đó là dịch bùng phát có nguồn gốc bên ngoài tiểu lục địa Ấn Độ. Có nguồn gốc từ Sulawesi (Celebes), Indonesia. Từ đây dịch lan đến Hong Kong và Philippines và xâm nhập vào Ấn Độ vào năm 1964. Đến năm 1966 dịch xâm nhập và lan ra khắp nơi ở tiểu lục địa Ấn Độ và Tây Á. Sau đó dịch bùng phát lan ra Châu Phi và nhiều phần của Nam Âu vào những năm của thập niên 1970.

(2). Lần đầu tiên dịch bùng phát là do *V. cholerae* có kiểu sinh học Eltor ngược lại với sáu đợt dịch bùng phát trước đó là do *V. cholerae* có kiểu sinh học Cổ điển.

(3). *V. cholerae* có kiểu sinh học Eltor là nguyên nhân gây dịch bùng phát lần thứ bảy, gây bệnh ít nghiêm trọng hơn, phần lớn là nhẹ và bệnh không có triệu chứng điển hình. Tỷ lệ chết thấp nhưng tỷ lệ người mang mầm bệnh đặc trưng lại cao.

(4). *V. cholerae* có kiểu sinh học Eltor gần như thay thế cho chủng *V. cholerae* có kiểu sinh học Cổ điển sau khi dịch bùng nổ lan rộng. Tuy nhiên ở các quốc gia như Ấn Độ, hiếm khi chạm trán với các chủng *V. cholerae* có kiểu sinh học Cổ điển, nhưng ở Bangladesh, bệnh tả nổi lên là do các chủng *V. cholerae* có kiểu sinh học Cổ điển.

Năm 1992, một chủng mới là *V. cholerae* O139 nổi lên là nguyên nhân gây bộc phát dịch tả ở Ấn Độ. Chủng gây dịch mới này được báo cáo đầu tiên gây bùng phát tả ở Chennai vào năm 1992, sau đó các vụ bùng nổ tương tự xảy ra ở những nơi khác nhau thuộc Ấn Độ. Chủng mới này xâm nhập vào Bangladesh và lan ngang qua quốc gia này gây bùng phát dịch tả vào tháng Giêng 1993.

Bệnh tả lần đầu tiên xuất hiện ở Việt Nam năm 1850 với 2 triệu trường hợp. Từ năm 1910-1938, hàng năm số bệnh nhân mắc tả được thông báo dao động từ 5.000 - 30.000 người. Bệnh tả El Tor lần đầu tiên xuất hiện ở miền Nam Việt Nam vào năm 1964 với 20.009 người mắc bệnh trong đó 821 người tử vong. Đến năm 1975, ở miền Trung và miền Nam, bệnh tả xảy ra dưới dạng dịch lưu hành. Hàng năm có hàng trăm bệnh nhân bị bệnh tả được thông báo. Năm 1994, bệnh tả xuất hiện ở khu vực Tây Nguyên với 1.459 người bệnh. Sau năm 1975, do việc thông thương giữa hai miền Nam, Bắc, bệnh tả đã lây lan ra miền Bắc và gây ra những vụ dịch tả rải rác ở Hải Phòng. Từ năm 1993 -2004, dịch xảy ra ở cả ba miền Bắc, Trung, Nam với khoảng vài nghìn ca bệnh được báo cáo hàng năm. Tuy nhiên, bệnh không bùng phát thành dịch lớn, có rất ít trường hợp tử vong. Các năm 2005-2006, cả nước không ghi nhận trường hợp nào. Từ cuối năm 2007, dịch lại bùng phát ở 19 tỉnh/thành phố phía Bắc, hàng ngàn trường hợp mắc nhưng không có trường hợp nào tử vong (Cục Y tế Dự phòng, Bộ Y tế).

***V. cholerae* O139:** đây là *vibrio non-cholera* đầu tiên hay chủng *non-cholera* liên quan đến bộc phát dịch tả. Chủng này cũng gây bệnh ở các cá thể trước đây bị nhiễm các chủng *V. cholerae* O.

59.2.3.2. Môi trường sống

V. cholerae là vi khuẩn sống trong môi trường nước có muối. Hệ sinh thái biển liên quan đến sinh vật phù du (plankton) là môi trường sống chủ yếu của vi khuẩn này. Khuẩn này có thể nhân tế bào lên một cách tự do trong nước. Số lượng vi khuẩn trong nước bị ô nhiễm tăng lên khi nước ấm lên và trong những tháng nóng trong năm. *V. cholerae* chưa bao giờ được phát hiện ở người. Ở những cá thể bị nhiễm, *V. cholerae* sống trong ruột non.

59.2.3.3. Nguồn và sự lan truyền bệnh

Con người và nước là hai nguồn lây nhiễm tả chính. Người mang khuẩn mạn tính và người sau khi được điều trị hết bệnh nhưng vẫn còn mang vi khuẩn đóng vai trò là nguồn truyền nhiễm quan trọng. Họ tiếp tục tiết ra vibrio trong phân của họ theo từng đợt trong một số năm.

Động vật không đóng vai trò gì trong lan truyền bệnh. Bệnh được truyền sang người là do tiêu thụ phải thức ăn và nước uống bị nhiễm khuẩn. Theo đó tỷ lệ bệnh truyền nhiễm cao nhất ở những nơi mà chuẩn mực về vệ sinh cộng đồng thấp và nước uống sạch không có. Liều xâm nhiễm *V. cholerae* thường cao và lớn hơn 10^6 vi khuẩn/mL, do hầu hết vi khuẩn bị tiêu diệt trong môi trường acid dạ dày và *V. cholerae* không thể sống sót trong môi trường acid này. Vì vậy bất kỳ trường hợp nào làm giảm acid dạ dày cũng làm cho người đó nhạy cảm cao với vi khuẩn tả. Sự lan truyền bệnh do tiếp xúc trực tiếp từ người sang người thì hiếm khi xảy ra. Tất cả các giai đoạn tuổi ở người đều nhạy cảm với sự xâm nhiễm do *V. cholerae*. Tuy nhiên trẻ sơ sinh sẽ được bảo vệ nhờ kháng thể mẹ truyền qua trẻ trong quá trình cho bú.

59.2.4. Phát hiện tại phòng thí nghiệm

59.2.4.1. Mẫu vật

Mẫu phân tươi được thu thập trước khi bệnh nhân điều trị kháng sinh là mẫu được lựa chọn để phân tích vi khuẩn. Phân có thể được thu thập bằng cách sử dụng ống cao su mềm vô trùng, có thể sử dụng vật chứa có nắp vặn để thu nhận mẫu phân lỏng. Không nên thu thập mẫu phân từ bô do nguy cơ bị nhiễm và có thể có chất khử trùng. Swab trực tràng cũng có thể được sử dụng để thu thập mẫu. Phương pháp này thường được sử dụng để thu thập mẫu phân từ người mang khuẩn tạm thời. Không nên sử dụng chất nôn làm mẫu vật. Mẫu phân và swab trực tràng cần phải nhanh chóng đưa về phòng thí nghiệm để nuôi cấy:

(a). Nếu vì lý do nào đó không thể vận chuyển sớm về phòng thí nghiệm, cần bảo quản mẫu ở 4°C hoặc trong tủ lạnh hoặc trong môi trường vận chuyển được sử dụng cho *V. cholerae*.

(b). Mẫu có thể được vận chuyển trong môi trường tăng sinh như alkaline peptone water hay môi trường vận chuyển Monsur's taurocholate và chuyển về phòng thí nghiệm.

(c). Trong trường hợp vận chuyển lâu hơn, mẫu phân có thể bảo quản trong môi trường Cary–Blair hay trong dịch VR trong thời gian dài.

(d). Trong trường hợp không có sẵn môi trường vận chuyển, mẫu phân nước có thể được ngâm trong mảnh giấy thấm dày, đóng gói trong bọc plastic và chuyển về phòng thí nghiệm.

Đối với mẫu thực phẩm, mẫu sau thu thập cần nhanh chóng bảo quản lạnh ở 7°C đến 10°C, sau đó phân tích càng nhanh càng tốt. Để vibrio sống sót và phục hồi tối đa, mẫu cần tránh tiếp xúc với nước đá lạnh. Vibrio có thể bị tổn thương do làm lạnh nhanh nhưng lại tăng trưởng nhanh chóng trong thủy sản ở nhiệt độ phòng. Mặc dù vibrio được cho là dễ bị chết khi có sự dao động lớn về nóng và lạnh nhưng sự tồn tại của chúng được tăng cường trong điều kiện nhiệt lạnh nhẹ. Khi cần bảo quản đông mẫu nên bảo quản ở nhiệt độ -80°C, nếu có thể.

Mẫu nhuộm thể cần được xử lý theo quy trình chuyên biệt. Lấy từ 10 - 20 tách vỏ và đồng nhất mẫu bằng máy xay tốc độ cao trong 90 giây. Sau đó pha loãng mẫu bằng dung dịch có NaCl như PBS chẳng hạn.

59.2.4.2. Soi dưới kính hiển vi

Soi kính hiển vi trường tối là phương pháp được sử dụng để chứng minh đặc tính di động của vi khuẩn và sự ức chế bằng kháng huyết thanh. Đây là phương pháp xét nghiệm nhanh trực tiếp mẫu phân hoặc mẫu sau 6 giờ tăng sinh. Phát huỳnh quang miễn dịch trực tiếp là phương pháp nhanh khác được sử dụng để chứng minh vibrio có trong mẫu phân. Tuy nhiên không nên sử dụng nhuộm Gram làm phương xét nghiệm chẩn đoán tả.

59.2.4.3. Nuôi cấy

Mẫu phân sau thu thập giữ trong môi trường được cấy vào môi trường tăng sinh (APW) và ủ trong 6 - 8 giờ trước khi cấy chuyển sang môi trường chọn lọc là TCBS hay GTTA và môi trường không chọn lọc là BSA, MacConkey và thạch máu. Cũng có thể cấy mẫu trực tiếp trên đĩa trên các đĩa môi trường này trước khi tăng sinh. Mẫu thu thập được giữ trong môi trường vận chuyển và ủ trong 6 - 8 giờ bao gồm cả thời gian vận chuyển trước khi cấy vào môi trường phù hợp. Các đĩa môi trường cấy khuẩn được ủ ở

37°C qua đêm. *V. cholerae* hình thành khuẩn lạc có màu vàng đặc trưng trên môi trường TCBS khuẩn lạc không lên men lactose trên môi trường thạch MacConkey.

Đối với mẫu thực phẩm, 25g mẫu đồng nhất trong 225g APW (alkaline peptone water) ủ trong 6 giờ ở 37°C nếu là mẫu đông lạnh, mẫu sản phẩm khô hoặc mẫu ướp muối, nếu là mẫu thực phẩm tươi ủ trong 6 giờ ở 41,5°C trước khi cấy chuyển sang môi trường TCBS đêm ở 37°C sau đó phân lập trên môi trường chọn lọc là TCBS.

59.2.4.4. Định danh vi khuẩn

Lựa chọn các khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường chọn lọc để tiến hành thử nghiệm phản ứng sinh hóa, gồm thử nghiệm oxidase, sử dụng amino acid như lysine, ornithine và arginine; lên men đường; tiêu huyết trên môi trường thạch máu cừu; thử nghiệm VP; nhạy cảm với polymyxin B; và phân kiểu huyết thanh sử dụng kháng huyết thanh đa giá.

59.2.4.5. Đặc điểm xác định *Vibrio cholerae*

(1). Khi nhuộm Gram biểu hiện kiểu hình dạng phẩy khuẩn, Gram âm điển hình có dạng hình phẩy, có đầu cuối tròn hoặc nhọn nhẹ.

(2). *V. cholerae* biểu hiện kiểu di động nhanh như tên bắn.

(3). Khuẩn này lên men đường glucose, sucrose, maltose, mannitol và mannose tạo acid nhưng không sinh hơi.

(4). *V. cholerae* có indole dương, khử nitrate thành nitrite.

(5). Khuẩn này có catalase và oxidase dương.

(6). *V. cholerae* sử dụng amino acid như lysine và ornithine nhưng không sử dụng arginine.

(7). Phân kiểu sử dụng kháng huyết thanh đa giá chuyên biệt - *Vibrio cholerae* O1 ngưng kết với kháng huyết thanh nhóm O1 và được gọi là vibrio tả hay vibrio ngưng kết với kháng huyết thanh.

(8). *V. cholerae* non-O1 không ngưng kết nhóm kháng huyết thanh nhóm O1 và được ấn định vibrio non-cholera hay vibrio không ngưng kết với huyết thanh kháng.

(9). *V. cholerae* O1 được chia thành hai kiểu sinh học là Cổ điển hay Eltor phụ thuộc vào phản ứng sinh hóa (Bảng 59.3).

Phân kiểu huyết thanh: sử dụng kháng huyết thanh *V. cholerae* O1 chuyên biệt để thử nghiệm ngưng kết *V. cholerae* nghi ngờ trên lam kính. Trong thử nghiệm này, dùng que cấy dích lấy khuẩn lạc trộn với 1 giọt kháng huyết thanh trên lam kính. Nếu có ngưng kết là *V. cholerae* O1. Sử dụng các huyết thanh Inaba và Ogawa để phân kiểu huyết thanh cho vi khuẩn *V. cholerae* O1. Các chủng Hikojima ngưng kết với cả hai huyết thanh Inaba và Ogawa. Nếu thử nghiệm cho kết quả ngưng kết âm, tiến hành lặp lại ít nhất 5 khuẩn lạc cho cả vibrio O1 và vibrio non-O1 trên cùng một mẫu.

Phân kiểu sinh học: nếu sự ngưng kết trên lam kính cho kết quả dương và khuẩn lạc được xác định là *V. cholerae* O1, tiếp theo sau đó cần phải tiến hành một số thử nghiệm nhiều khác để xác định *V. cholerae* O1 này có kiểu sinh học là Cổ điển hay là Eltor. Các thử nghiệm này gồm tiêu huyết tế bào máu đỏ (RBC) cừu, ngưng kết RBC gà, nhạy cảm với polymyxin B, thử nghiệm VP và nhạy cảm với bacteriophage (Bảng 59.2).

Các khuẩn lạc *Vibrio* không ngưng kết với huyết thanh kháng *V. cholerae* O1 thường được thử nghiệm với huyết thanh kháng cho kháng nguyên H. Các chủng phân lập *Vibrio* được ngưng kết bằng huyết thanh kháng H nhưng không ngưng kết với kháng huyết thanh O1 được xác định là vibrio cholera non-O1. Nhưng vibrio non-cholera được xác định là O139 bằng cách sử dụng kháng huyết thanh chuyên biệt chống lại kháng nguyên O139.

59.2.4.6. Xác định độc tính gây bệnh đường ruột

Hầu hết các chủng *V. cholerae* phân lập từ thực phẩm hoặc môi trường đều không tạo độc tố cholera (CT) và không được xem là độc. Các chủng phân lập được xác định là *V. cholerae* hay *V. mimicus* cần được kiểm tra khả năng sản sinh CT hay có gen *ctx*.

Phương pháp sử dụng tế bào Y-1 thượng thận chuột: Theo đó CT được chứng minh là kích thích enzyme adenylate cyclase cùng với đó là sản sinh ra cyclic adenosine monophosphate để rồi làm ảnh hưởng đến một số quá trình tế bào. Trong phương pháp sử dụng tế bào Y-1, CT thúc đẩy sự chuyển đổi các tế bào tương tự nguyên bào sợi (fibroblast) kéo dài bao xung quanh tế bào co (refractile cell).

Phương pháp miễn dịch phát hiện CT: hiện nay có sẵn chế phẩm (kit) thương mại dùng để phát hiện CT của *V. cholerae* và *V. mimicus*

59.2.4.7. Xác định các độc tố khác

Tầm quan trọng của các độc tố khác trong phát sinh bệnh ở người thì chưa được hiểu rõ nên chưa có phương pháp chính thức để phát triển thành phương pháp phân tích thường quy. Madden và cộng sự đã chứng minh các chủng phân lập lâm sàng gây bệnh cho thỏ mới sinh. Cytolysin không bền nhiệt do *V. cholerae* non-O1/O139 sản sinh ra cũng được McCardell và cộng sự phát hiện ra, có độc tính tế bào đối với Y-1 thượng thận và tế bào buồng trứng của chuột Chinese hamster. Độc tố này nhanh chóng gây chết cho chuột trưởng thành khi tiêm vào tĩnh mạch và gây tích dịch trong thí nghiệm vòng hồi tràng ở thỏ.

59.2.4.8. Phương pháp sinh học phân tử

Phát hiện kiểu di truyền của gen sinh độc tố cholera bằng PCR. Gen CT có thể hiện diện trong các chủng *V. cholerae* và *V. mimicus*, nhưng không biểu hiện dưới điều kiện thực nghiệm. Vì vậy cần sử dụng phương pháp PCR để khuếch đại gen *ctx*. Đây là quy trình cho kết quả nhanh hơn và ít phức tạp hơn so với phương pháp xác định kiểu hình.

Có thể sử dụng mỗi sử dụng để khuếch đại gen *ctx*, mỗi xuôi 5'-tga aat aaa gca gtc agg tg-3'; mỗi ngược 5'-ggg att ctg cac aca aat cag-3'. Sản phẩm PCR là đoạn DNA có kích thước 777 bp.

59.2.4.9. Xác định người mang khuẩn

Nuôi cấy lặp lại mẫu phân thì cần thiết để phân lập *V. cholerae* từ người mang mầm bệnh bởi vì vibrio được tiết qua đường phân. Thu thập mẫu phân sau khi sử dụng thuốc xổ (dạng mannitol hay magnesium sulphate) hoặc xét nghiệm mật thu thập bằng cách luồn ống vào tá tràng, thường được sử dụng để xác định người mang khuẩn này

59.2.4.10. Chẩn đoán bằng huyết thanh

Phương pháp kháng thể vibrio phụ thuộc vào bổ thể và phương pháp kháng độc tố sử dụng dịch huyền phù có vibrio còn sống hoặc đã bị tiêu diệt là hai phương pháp thường được sử dụng để chứng minh kháng thể của vibrio có trong huyết thanh. Các thử nghiệm này cũng được sử dụng trong nghiên cứu miễn dịch học huyết thanh nhưng lại ít có giá trị sử dụng trong chẩn đoán các ca mắc bệnh.

59.2.5. Điều trị

Điều trị tả gồm (a) thay thế dịch và chất điện giải và (b) sử dụng kháng sinh.

59.2.5.1. Thay thế dịch và chất điện giải

Điều trị bệnh tả chủ yếu dựa vào việc thúc đẩy và thay thế đủ dịch và chất điện giải, trước khi mất một lượng lớn dịch dẫn đến sốc giảm thể tích (hypovolemic shock). Thay thế dịch bằng cách đưa dịch chứa glucose và chất điện giải là giải pháp thành công nhất và hiệu quả cao để điều trị bệnh tả. Liệu pháp đưa dung dịch vào đường miệng (ORT) gồm glucose, sodium chloride, potassium chloride và sodium citrate được sử dụng rộng rãi. Glucose là phương tiện hấp thu thuận lợi sodium trong ruột non và muối hiện diện trong ORT, giúp hoàn trả lại sự cân bằng chất điện giải và nhờ đó làm đảo ngược chứng nhiễm acid.

Liệu pháp ORT thì rẻ, hiệu quả cao và đơn giản để sử dụng; vì vậy liệu pháp này được sử dụng rộng rãi ở các nước đang phát triển có dịch tả cục bộ. Liệu pháp truyền dịch ngay vào tĩnh mạch thường áp dụng cho các trường hợp mất nước nghiêm trọng. Sử dụng súp dạng bột ngũ cốc chín hoặc nước cơm có muối cũng là giải pháp hiệu quả để bù nước cho các trường hợp tả.

59.2.5.2. Liệu pháp kháng sinh

Liệu pháp kháng sinh là liệu pháp quan trọng thứ hai bổ sung cho liệu pháp truyền dịch. Điều trị bằng kháng sinh sẽ làm giảm bớt thời gian và thể tích dịch mất đi. Kháng sinh cũng giúp loại bỏ nhanh vi khuẩn *Vibrio* ra khỏi ruột. *V. cholerae* nhạy cảm với tetracycline, ciprofloxacin và erythromycin. Tetracycline hay doxycycline là kháng sinh lựa chọn cho người lớn và trimethoprim - sulfamethoxazole cho trẻ em. Pyrazolidone thường được khuyến cáo dùng để điều trị cho phụ nữ mang thai bị bệnh tả. Hiện nay các chủng tả kháng ciprofloxacin đã được ghi nhận.

59.2.6. Phòng ngừa và kiểm soát

Biện pháp phòng ngừa chống lại cholera gồm (a). Các biện pháp phòng ngừa tổng thể và (b). Tiêm vaccin cholera.

59.2.6.1. Các biện pháp phòng ngừa tổng thể

Các biện pháp này gồm xác định sớm và quản lý môi trường, cải thiện chất lượng

nước cấp và vệ sinh, áp dụng các chương trình quản lý chất lượng trong các nhà máy chế biến thực phẩm nhằm tạo ra sản phẩm đạt chất lượng và đáp ứng yêu cầu vệ sinh, hạn chế sử dụng nguồn nước bẩn, cải thiện vệ sinh cá nhân và giáo dục về sức khỏe.

Vaccine tả chứa vi khuẩn chết: đây là vaccine truyền thống được sử dụng chống lại bệnh tả. Vaccine này là dịch huyền phù chứa 8.000 triệu *V. cholerae*/ml, gồm một lượng đủ kiểu huyết thanh Inaba và Ogawa. Vaccine được tiêm vào cơ thể 2 liều cách nhau 4 tuần hoặc qua đường dưới da hoặc qua đường tĩnh mạch. Vaccine bảo vệ khoảng 60% trong thời gian ngắn là 3 - 6 tháng. Tỷ lệ bảo vệ trong các vùng xảy ra dịch cục bộ thì tăng theo độ tuổi. Trẻ dưới 5 tuổi nếu chỉ tiêm một liều vaccin thì không hiệu quả nhưng người lớn thì ngược lại. Để cải thiện sự kích thích kháng nguyên, thì cần phải có một lượng lớn vi sinh vật trong vaccine lên 12.000 triệu/mL.

Vaccine uống có tế bào nguyên vẹn đã chết và có tiểu đơn vị B: vaccine này gồm tế bào vi khuẩn *V. cholerae* O1 đã được giết chết bằng nhiệt kết hợp với tiểu đơn vị B tái tổ hợp của biến độc tố tả (WC/rBS). Vaccine này được dùng hai liều cách nhau 1 tuần. Các thử nghiệm được tiến hành ở Bangladesh, Peru và Thụy Điển cho thấy vaccine này an toàn và mức bảo vệ là 85 - 90% trong 6 tháng ở tất cả các nhóm tuổi sau khi sử dụng hai liều.

Vaccine tả (vaccine CVD 103-Hg R): vaccine CVD 103-Hg R là vaccine tả sử dụng qua đường miệng. Vaccine này gồm chủng *V. cholerae* O1 (CVD 103-Hg R) đã được biến đổi về di truyền và đã được làm yếu, sử dụng qua đường miệng. Vaccine này là yếu tố sinh miễn dịch vô cùng mạnh và có mức bảo vệ cao chống lại các ca bệnh tả vừa phải và nghiêm trọng. Các thử nghiệm trên diện rộng vaccine này trên những người lớn tự nguyện tại Hoa Kỳ đã chứng minh, khi sử dụng 1 liều cho thấy mức bảo vệ rất cao lên đến 95% chống lại *V. cholerae* kiểu Cổ điển và 65% chống lại *V. cholerae* kiểu Eltor, tiếp theo là liều nhắc lại sau 3 tháng.

59.3. Vibrio non-cholera

V. cholerae có kiểu huyết thanh từ O2 đến O139 là vibrio non-cholera, là vibrio không ngưng kết hay còn gọi là *V. cholerae* non-O1. Nhóm này tương tự như *V. cholerae* O1 về sinh hóa và di truyền. *V. cholerae* O139 là một ví dụ về nhóm vibrio non-cholera,

gây bệnh tả như đã đề cập ở trên. *Vibrio non-cholera* khác ngoài *V. cholerae* O139 phổ biến trong môi trường nước. Ở người nhóm này có thể gây bệnh tiêu chảy nhẹ giống như tả. Đôi khi chúng cũng có thể gây nhiễm trùng vết thương, nhiễm trùng máu và các nhiễm trùng ngoài đường ruột khác.

59.3.1. *Vibrio mimicus*

V. mimicus liên quan đến nhiều trường hợp tiêu chảy xảy ra ở vùng duyên hải thuộc vịnh của Hoa Kỳ. *V. mimicus* có nhiều phản ứng sinh hóa giống với *V. cholerae* và khác với *V. cholerae* ở chỗ không lên men sucrose. Ngoài ra khuẩn này giống *V. cholerae* là tăng trưởng tốt ở 0,5 - 1% sodium chloride. Bệnh do vi khuẩn này gây ra mắc phải do ăn phải hải sản, nhất là sò. Khuẩn này gây bệnh dạ dày ruột và người mắc phải bệnh do vi khuẩn này thường tự khỏi.

59.3.2. *Vibrio* ưa mặn

Là các vibrio đòi hỏi phải có sodium chloride cho tăng trưởng gọi là *Vibrio* ưa mặn. Chúng là những vi sinh vật tự nhiên trong nước biển và đời sống ở biển. *V. parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* và *V. vulnificus* là ba loài vibrio ưa mặn quan trọng gây bệnh ở người.

59.3.3. *Vibrio parahaemolyticus*

59.3.3.1. Đặc điểm chung

Lần đầu tiên trên thế giới vào năm 1950, Fujuko (Nhật Bản) đã phát hiện ra một chủng vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy do ăn cá biển nhưng chưa biết xếp vào loại vi khuẩn gì. Đến năm 1965, Sakazuki (Nhật Bản) mới xác định được vi khuẩn này là *Vibrio parahaemolyticus*. *V. parahaemolyticus* hiện nay được công nhận là nguyên nhân quan trọng gây viêm dạ dày ruột do liên quan đến tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm trong đó có thủy sản, bệnh do *V. parahaemolyticus* phổ biến trên toàn thế giới.

V. parahaemolyticus là trực khuẩn cong, Gram âm, tương tự như *V. cholerae*. Tuy nhiên khác với *V. cholerae* ở chỗ có capsule, biểu hiện lưỡng cực và đa hình khi nhuộm Gram. Khuẩn này biểu hiện đa hình trong điều kiện nuôi ở nhiệt độ lạnh hay tăng trưởng trong môi trường thạch có 3% muối. Giống như các vibrio khác, *V. parahaemolyticus* có tiên mao đỉnh làm phương tiện di chuyển khi chúng tăng trưởng trong môi trường lỏng,

nhưng lại biểu hiện tiên mao xung quanh khi tăng trưởng trên môi trường rắn.

Khuẩn này thường được phân lập từ các vùng nước duyên hải và thủy sản ở các vùng ôn đới khắp nơi trên thế giới. *V. parahaemolyticus* thường gây bệnh qua đường thực phẩm phổ biến nhất ở Nhật, nơi mà nhiều người thích ăn thủy sản sống. Một số vụ bùng nổ bệnh viêm dạ dày ruột do *V. parahaemolyticus* cũng xảy ra ở Hoa Kỳ do tiêu thụ sò cùng với đó là một số thực phẩm khác có liên quan như cua, tôm và tôm hùm, ngược lại ở Nhật là do tiêu thụ cá chưa qua nấu chín trước khi ăn. Thao tác chế biến sai cách như bảo quản không đủ lạnh, nấu không chín, nhiễm chéo hoặc tái nhiễm là những lý do liên quan đến các vụ ngộ độc này. Việc tiêu thụ sò sống làm bùng nổ trên diện rộng bệnh viêm dạ dày ruột do *V. parahaemolyticus* gây ra ở vùng Bờ Tây vào năm 1997, Texas và New York năm 1998. Các chủng phân lập từ lâm sàng ở Bờ Tây có enzyme urease và có cả gen *tdh* và *trh*. Các vụ bùng nổ ở Texas và New York là do kiểu huyết thanh O3:K6 không có enzyme urease và chỉ có gen *tdh*. Chủng này làm xuất hiện dịch trên diện rộng và cũng là chủng phổ biến nhất ở Châu Á.

Vibrio Parahaemolyticus là một trong 3 chủng vi khuẩn gây Bệnh tiêu chảy (*Salmonella*, *Shigella*) hiện được xem là mối đe dọa, gánh nặng bệnh tật đến sức khỏe người Việt Nam. Đây là một trong những bệnh dịch có nguy cơ nhiều người mắc do sử dụng thực phẩm không đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm.

Trong một cuộc điều tra tổng quát về sự tăng vọt, những trường hợp nhiễm vi khuẩn này từ 1996 - 2000, các nhà điều tra đã tìm ra 3 type huyết thanh có khả năng gây dịch: Năm 1996, chủng O3.K6 đã xuất hiện ở 8 quốc gia. Sự lây lan nhanh chóng và rộng khắp của chúng gây dịch *V. parahaemolyticus* đầu tiên và những quốc gia bị ảnh hưởng gồm Ấn Độ, Đông Nam Á và Mỹ. Hai chủng khác: O4.K68 và O1.K không định được týp (KUT) có liên quan và được thừa nhận là bắt nguồn từ dòng vô tính O3.K6 gây dịch. Do đó, các nhà khoa học tin chắc dòng vô tính này chịu trách nhiệm về sự xuất hiện của các týp huyết thanh gây dịch với các kháng nguyên xoma và vỏ khác nhau. Họ cũng gợi ý rằng các chủng liên quan dịch tễ với nhau có thể có liên quan về mặt di truyền ... Theo các nhà khoa học Ấn Độ và Nhật Bản, cần nghiên cứu thêm về nguồn gốc bất ngờ của dòng *Vibrio parahaemolyticus* gây dịch.

Mùa hè năm 2004, một số du khách đến vùng biển ở Alaska (Mỹ) đã bị tiêu chảy và nôn tháo sau khi ăn sò nướng. Các nhà khoa học tìm hiểu và nhận thấy vùng này trước đây rất lạnh, người ta có thể yên tâm ăn món sò nướng đặc sản vùng này mà không sợ đau bụng. Tuy nhiên, do biến đổi khí hậu nhiệt độ tăng lên đã dẫn đến quá trình phân phối lại bản đồ các loại vi khuẩn, sâu bọ và cây cối. Nhiệt độ nước biển ở Alaska đã vượt ngưỡng 15°C và lần đầu tiên họ phát hiện *Vibrio parahaemolyticus*, một loài vi khuẩn khá phổ biến ở vùng vịnh Mexico ấm áp, trong món sò ở Alaska.

Ở Việt Nam trước đây đã có báo cáo phân lập được vi khuẩn này từ phân một bệnh nhân tiêu chảy do ăn cá biển nấu chưa chín và từ một số hải sản như tôm, cua, sò... nhưng ít được chú ý. Từ sau vụ ngộ độc thức ăn tập thể do ăn tôm rang bị nhiễm *Vibrio parahaemolyticus* ở Hải Phòng năm 1983, vấn đề này mới được quan tâm hơn. Năm 2002, một nghiên cứu tiến cứu do Viện Pasteur Nha Trang thực hiện ở tỉnh Khánh Hòa trong thời gian 1/1995 - 9/2001 ghi nhận 548 trường hợp tiêu chảy, khi xét nghiệm có 53% dương tính với *V. parahemolyticus*.

V. parahaemolyticus có nhu cầu dinh dưỡng đơn giản nhưng đòi hỏi phải có muối để tăng trưởng và không thể tăng trưởng được trong môi trường không có sodium chloride. Khuẩn này có thể tăng trưởng tốt ở nồng độ muối trên 8% và tối thích ở hàm lượng muối trong khoảng 2 - 4%.

Trên môi trường thạch MacConkey, *V. parahaemolyticus* hình thành khuẩn lạc không màu do không lên men được lactose. Trên môi trường thạch máu, khuẩn này hình thành khuẩn lạc tiêu huyết beta. Trên môi trường thạch TCBS, khuẩn này hình thành khuẩn lạc có màu xanh do không lên men được saccharose, cùng với đó tâm khuẩn lạc nổi lên có màu đục mờ và rìa trong mờ.

V. parahaemolyticus có oxidase, catalase, indole và citrate dương. Khuẩn này khử nitrate thành nitrite. Nó có khả năng lên men glucose, mannose, maltose, mannitol và arabinose để tạo duy nhất là acid. *V. parahaemolyticus* không lên men sucrose, lactose và salicin. Nó có khả năng khử nhóm carboxyl của lysine và ornithine nhưng arginine thì không. Thử nghiệm phản ứng VP cho kết quả dương.

V. parahaemolyticus là vi khuẩn không bền nhiệt, dễ dàng bị phá hủy ở 60°C trong

15 phút. Khuẩn này nhạy cảm với sự làm khô, nước cất và giấm theo đó chúng sẽ bị giết chết khi đối mặt với các điều kiện trên trong vòng vài phút. Tuy nhiên khuẩn này có thể vẫn còn sống sót trong điều kiện lạnh và đông lạnh. Khi thực nghiệm trong pha muối, *V. parahaemolyticus* có thể phát triển ở thể nước nhỏ nhất là 0,94, phần trăm nước pha muối là 10. Khuẩn này tăng trưởng trong khoảng nhiệt độ từ 5°C - 45,3°C và trong khoảng pH 4,8 - 11.

59.3.3.2. Phân kiểu huyết thanh

V. parahaemolyticus có ba kháng nguyên gồm: kháng nguyên thân O, kháng nguyên tiên mao H và kháng nguyên capsule K. Phân kiểu huyết thanh được dựa trên kháng nguyên O và K. Kháng nguyên H phổ biến trong tất cả các chủng *V. parahaemolyticus* và ít có giá trị trong phân kiểu. Kháng nguyên K hay kháng nguyên capsule có thể được loại bỏ khỏi tế bào bằng cách đun nóng ở 100°C chủng phân lập trong vòng 1 hoặc 2 giờ. Quá trình này làm lộ ra kháng nguyên O hay kháng nguyên thân bền nhiệt. Do kháng nguyên K che lấp kháng nguyên O nên cần thiết phải loại bằng nhiệt trước khi tiến hành thử nghiệm ngưng kết kháng nguyên O.

Có 12 nhóm kháng nguyên O và trên 70 kháng nguyên K. Trong đó 5 kháng nguyên K đã được phát hiện xuất hiện cùng với một hoặc hai nhóm kháng nguyên O; vì vậy có đến 76 kiểu huyết thanh đã được công nhận (Bảng 59.6). Cấu trúc kháng nguyên của *V. parahaemolyticus* do Sakazaki và cộng sự thiết lập đầu tiên và sau đó được Ủy ban về phân kiểu huyết thanh *V. parahaemolyticus* Nhật Bản mở rộng theo đó kiểu kháng nguyên K 2,14,16,29,35 và 62 được bỏ ra. Kiểu kháng nguyên K K 4,5,6,7,8,9 và 19 xuất hiện với nhiều hơn một nhóm kháng nguyên O. Thử nghiệm huyết thanh không được sử dụng để xác định *V. parahaemolyticus* bởi vì có phản ứng chéo với nhiều vi khuẩn biển khác. Tuy nhiên quá trình khảo sát các vụ bùng nổ ngộ độc thực phẩm thì thử nghiệm huyết thanh trở nên là công cụ dịch tễ có giá trị.

Bảng 59.6. Cấu trúc kháng nguyên của *V. parahaemolyticus*.

Nhóm O	Kiểu K
1	1, 25, 26, 32, 38, 41, 56, 58, 64, 69
2	3, 28
3	4, 5, 6, 7, 27, 30, 31, 33, 37, 43, 45, 48, 54, 57, 58, 59, 65

4	4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 34, 42, 49, 53, 55, 63, 67
5	5, 15, 17, 30, 47, 60, 61, 68
6	6, 18, 46
7	7, 19
8	8, 20, 21, 22, 39, 70
9	9, 23, 44
10	19, 24, 52, 66, 71
11	36, 40, 50, 51, 61
12	52
Tổng 12	65

Chế phẩm huyết thanh kháng (dạng kit thử) dùng để phát hiện *V. parahaemolyticus* đã được công ty Nichimen Co phát triển thành sản phẩm thương mại. Nhưng do huyết thanh kháng này đắt nên hầu hết các phòng thí nghiệm ít sử dụng ngoại trừ một số phòng đặc biệt như CDC chẳng hạn.

59.3.3.3. Xác định đặc tính gây bệnh

Kato và cộng sự đã chứng minh rằng các chủng phân lập *V. parahaemolyticus* từ phân người bị bệnh thì có hoạt tính tiêu huyết trên môi trường thạch máu người đặc biệt có hàm lượng muối cao, ngược lại các chủng phân lập *V. parahaemolyticus* từ thủy sản và nước biển thường không có hoạt tính tiêu huyết. Sau đó Wagatsuma đã cải biên môi trường thạch đặc biệt này để tránh nhầm lẫn với hoạt tính tiêu huyết bình thường của *V. parahaemolyticus* trên môi trường thạch máu truyền thống có 5 % máu cừu. Môi trường thạch máu đặc biệt này được đặt tên là môi trường thạch Wagatsuma và phản ứng tiêu huyết đặc biệt được gọi là hiện tượng Kanagawa. Máu người, máu chó hoặc cừu tươi được sử dụng để điều chế môi trường thạch máu.

Hầu hết các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh ở người là có Kanagawa dương. Các chủng phân lập từ thủy sản luôn luôn có Kanagawa âm. Hơn nữa khảo sát mở rộng trên động vật cho thấy rằng tiêu huyết Kanagawa là yếu tố gây bệnh chủ yếu ở *V. parahaemolyticus*. Thử nghiệm Kanagawa hay lai với mẫu dò gen *tdh* sẽ cung cấp thông tin đáng tin cậy về sự hiện diện của các chủng gây bệnh phân lập được từ thực phẩm. Do khó khăn trong việc thu nhận máu tươi và mối tương quan đáng kể giữa hiện tượng Kanagawa và sự có mặt của gen *tdh*, nên phương pháp mẫu dò DNA được sử dụng để xác định độc lực tiềm ẩn của các chủng phân lập *V. parahaemolyticus* thay cho hiện

tượng Kanagawa.

TDH (Thermostable direct hemolysin) là yếu tố gây độc chính của *V. parahaemolyticus*. Yếu tố gây độc này chỉ được phát hiện trong các chủng gây bệnh cho người. Các chủng phân lập từ người có độc tố này nên là chủng gây bệnh, trong khi đó các chủng phân lập từ môi trường như nước, cua, sò hay cá thì không có độc tố bền nhiệt này.

Hiện tượng Kanagawa: các chủng gây bệnh của *V. parahaemolyticus* khi tăng trưởng trên môi trường đặc biệt có mannitol, muối cao (môi trường thạch Wagatsuma) biểu hiện sự tiêu huyết trên môi trường thạch máu. Sự tiêu huyết này được tạo ra là do độc tố tiêu huyết bền nhiệt từ các chủng gây bệnh phóng thích ra, các chủng này được gọi là các chủng Kanagawa dương. Các chủng không gây bệnh phân lập từ môi trường không gây ra hiện tượng tiêu huyết trên môi trường thạch máu được gọi là các chủng Kanagawa âm.

V. parahaemolyticus phân bố rộng khắp ở cửa sông và môi trường biển. Sản phẩm thủy sản như cá, cua hay sò là nguồn xâm nhiễm chính. Sự lây nhiễm vi khuẩn này mắc phải là do tiêu thụ thủy sản chưa được nấu chín đủ.

59.3.3.4. Phát hiện bằng phương pháp sinh học phân tử

Phát hiện gen tiêu huyết của *V. parahaemolyticus* bằng cách sử dụng mẫu dò DNA có gắn alkaline phosphatase và digoxigenin. Gen tiêu huyết không bền nhiệt *tlh* được phát hiện trong tất cả các chủng *V. parahaemolyticus* nhưng các loài khác thì không và mẫu dò DNA được sử dụng để xác định gen này. Mẫu dò DNA đã được cấu trúc để phát hiện gen tiêu huyết bền nhiệt *tdh* và gen tiêu huyết tương đối bền nhiệt *trh* liên quan đến các chủng gây bệnh ở người.

Bảng 59.7. Trình tự mẫu dò.

Tiêu huyết không bền nhiệt đặc trưng cho loài (<i>tlh</i>)	Gắn AP: 5'Xaa agc gga tta tgc aga agc act g 3' (trong đó X là gắn nhãn AP)
Tiêu huyết trực tiếp bền nhiệt (<i>tdh</i>), tiêu huyết Kanagawa	Gắn AP: 5'Xgg ttc tat tcc aag taa aat gta ttt g 3'.
Nguồn BAM, FDA.	

Mẫu dò *tlh* có gắn alkaline phosphatase (AP) đã được phát triển thành sản phẩm thương mại. Mẫu dò gắn digoxigenin cho *tlh* và *trh* được cấu trúc để khuếch đại các sản phẩm PCR sử dụng các bộ môi do Bej và cộng sự phát triển. Mẫu dò *tdh* được cấu trúc để sử dụng bộ môi dựa trên mẫu dò oligonucleotide của Nishibuchi và cộng sự, sử dụng *tdh1* làm môi xuôi và *tdh4* (*tdh4c*) làm môi ngược. Các mẫu dò này được gắn digoxigenin trong quá trình khuếch đại theo quy trình của Roche Diagnostics. Các sản phẩm PCR (amplicon) có kích thước như sau; 450 bp (*tlh*), 424 bp (*tdh*) và 500 bp (*trh*).

Bảng 59.8. Trình tự môi để khuếch đại cho mẫu dò gắn digoxigenin.

Gen	Mã hoá cho protein	Vị trí	Trình tự
<i>tlh</i>	Hemolysin không bền nhiệt)	L-TLH	5' aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg 3'
		R-TLH	5' gct act ttc tag cat ttt ctc tgc 3'
<i>tdh</i>	Hemolysin trực tiếp bền nhiệt (Kanagawa hemolysin)	tdh-1	5' cca tct gtc cct ttt cct gcc 3'
		tdh-4c	5' cca cta cca ctc tca tat gc 3'
<i>trh</i>	Hemolysin tương đối bền nhiệt	VPTRH-L	5' ttg gct tcg ata ttt tca gta tct 3'
		VPTRH-R	5' cat aac aaa cat atg ccc att tcc g 3'

Nguồn BAM, FDA.

Sử dụng multiplex PCR để xác định *V. parahaemolyticus*, multiplex PCR là kỹ thuật phân tích bằng để khẳng định các chủng phân lập *V. parahaemolyticus* nghi ngờ. Môi sử dụng trong kỹ thuật này được trình bày trong Bảng 59.9.

Bảng 59.9. Môi dùng để phân tích *V. parahaemolyticus* bằng kỹ thuật multiplex PCR.

Tên môi	Sản phẩm PCR	Vị trí	Trình tự
Gen <i>tlh</i> chuyên biệt cho loài	450 bp	L-TL	5' aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg 3'
		R-TL	5' gct act ttc tag cat ttt ctc tgc 3'
Gen <i>trh</i>	500 bp	VPTRH-L	5' ttg gct tcg ata ttt tca gta tct 3'
		VPTRH-R	5' cat aac aaa cat atg ccc att tcc g 3'
Gen <i>tdh</i>	270 bp	VPTDH-L	5' gta aag gtc tct gac ttt tgg ac 3'
		VPTDH-R	5' tgg aat aga acc ttc atc ttc acc 3'

59.3.3.5. Triệu chứng gây bệnh của *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus gây viêm dạ dày ruột ở người. Mức độ nghiêm trọng của

bệnh dao động từ tiêu chảy nhẹ tự giới hạn đến cấp tính. Sau giai đoạn ủ bệnh 5 - 72 giờ bệnh nhân bị chứng viêm dạ dày biểu hiện triệu chứng như tiêu chảy ra nước ủa eosin. Bệnh liên quan đến buồn nôn, nôn mửa, đau bụng và sốt ở cấp độ thấp xuất hiện trong vòng 3 ngày. Phân thường không có máu và chất nhầy nhưng chứa các chất tiết của tế bào. Bệnh nhân thường phục hồi trong vòng 3 ngày.

V. parahaemolyticus cũng gây nhiễm trùng ngoài đường ruột như nhiễm trùng vết thương, nhiễm trùng tai và mắt ở những cá thể thường phơi nhiễm với nước biển bị ô nhiễm.

59.3.4. *Vibrio alginolyticus*

V. alginolyticus là một loài vibrio ưa mặn khác. Khuẩn này chịu đựng được muối cao và thậm chí có thể tăng trưởng trên môi trường có 10% sodium chloride. Trên môi trường thạch TCBS, *V. alginolyticus* hình thành khuẩn lạc lớn có màu vàng do lên men được saccharose. Khuẩn này biểu hiện tăng trưởng thành đám trên bề mặt môi trường không chọn lọc như môi trường thạch máu chẳng hạn. *V. alginolyticus* phân bố rộng khắp trong môi trường nước biển và sản phẩm thủy sản. *V. alginolyticus* liên quan đến nhiễm trùng vết thương cận do phơi nhiễm với nước biển bị ô nhiễm. Khuẩn này cũng liên quan đến nhiễm trùng tuyến dạ dày ruột, tai và mắt. Đặc điểm phân biệt giữa *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* được tóm tắt tại Bảng 59.10.

Bảng 59.10. Đặc điểm khác biệt giữa *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio alginolyticus*.

Đặc điểm	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Tăng trưởng trong 10% agar	-	+
Hình thành đám (swarming)	-	+
Lên men sucrose	-	+
Thử nghiệm VP	-	+

59.3.5. *Vibrio vulnificus*

59.3.5.1. Đặc điểm chung

V. vulnificus là một vibrio ưa mặn, trước đây gọi là vibrio L⁺, hay *Benekea vulnificus*. Giống như *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* là trực khuẩn Gram âm, kỵ khí

tùy nghi đòi hỏi muối để tăng trưởng. Khuẩn này hình thành khuẩn lạc có màu xanh trên môi trường TCBS do không lên men được saccharose. *V. vulnificus* khác với *V. parahaemolyticus* và các loài *Vibrio* khác ở chỗ khuẩn này có khả năng lên men được lactose. Khi thực nghiệm trong pha muối, *V. vulnificus* có thể phát triển ở thể nước nhỏ nhất là 0,96, phần trăm nước pha muối là 10. Khuẩn này tăng trưởng trong khoảng nhiệt độ từ 5°C - 43°C và trong khoảng pH 5 - 10.

Loài *V. vulnificus* xâm nhiễm gây triệu chứng sốc nhiễm trùng huyết, là loài phổ biến xuất hiện ở vùng biển duyên hải. Các trường hợp bệnh nhiễm trùng huyết do vi khuẩn này sinh ra thường liên quan đến việc tiêu thụ sò sống. *V. vulnificus* cũng gây ra nhiễm trùng vết thương ở những người hoạt động trong môi trường biển. Loài này tăng trưởng tốt trên môi trường công thức có chứa tối thiểu 0,5% NaCl. Mặc dù độc lực liên quan đến capsule, nhưng cho đến nay người ta vẫn chưa xác định được marker đáng tin cậy. Hầu hết các thử nghiệm không thể phân biệt được các chủng lâm sàng và các chủng ngoài môi trường.

59.3.5.2. Đặc điểm gây bệnh

Một cách tương đối *V. vulnificus* là vi khuẩn có độc lực cao hơn so với *V. parahaemolyticus*. Về phương diện cấu trúc và sinh hóa, khuẩn này có capsule và sản sinh ra các enzyme thủy giải như cytolysin, protease và collagenase là những yếu tố gây độc của vi khuẩn. *V. vulnificus* cũng kháng được sự ly giải qua trung gian bổ thể và ly giải qua trung gian kháng thể. *V. vulnificus* thường sống trong môi trường nước biển.

Nhiễm trùng do *V. vulnificus* thường là qua đường thực phẩm là do (a) tiêu thụ thủy sản còn tươi hoặc chưa qua nấu chín đủ (b) vết thương phơi nhiễm với môi trường nước biển bị ô nhiễm.

Nhiễm trùng *V. vulnificus* ở người có hai kiểu: (a) nhiễm trùng vết thương và (b) viêm dạ dày ruột nhanh chóng tiến triển thành nhiễm trùng máu. Nhiễm trùng vết thương do nước biển bị ô nhiễm có thời gian ủ bệnh ngắn từ 3 - 24 giờ. Các vết thương thường có trên ngón tay, lòng bàn tay hay lòng bàn chân. Bệnh tiến triển nhanh chóng thành hoại tử, hoại thư hoặc viêm cân mạc hoại tử. Nhiễm trùng vết thương ở những bệnh nhân bị bệnh sơ gan hoặc ác tính có thể tiến triển rất nhanh cùng với đó là phát triển thành các nốt

xuất huyết và hoại tử lan rộng trên mô mềm.

Viêm dạ dày ruột tiến triển nhanh chóng thành nhiễm trùng máu xảy ra sau khi tiêu thụ thủy sản sống chưa qua nấu chín hoặc phơi nhiễm da bị thương trong môi trường nước biển bị ô nhiễm, sau thời gian ủ bệnh ngắn 12 - 48 giờ. Sau khi tiêu thụ vi khuẩn xâm nhập vào niêm mạc ruột nhưng không gây bất kỳ triệu chứng dạ dày ruột nào và nhanh chóng xâm nhập vào máu gây nhiễm trùng máu. Bệnh biểu hiện nhiều nốt xuất huyết và vết máu bầm lan rộng phân bố chủ yếu ở các chi dưới. Bệnh nhân thường bị chứng giảm huyết áp và phát triển chứng ít nước tiểu (oliguria) và chứng phù không do tim gây ra (noncardiogenic pulmonary edema). Bệnh thường có tỷ lệ chết cao khoảng 50%.

Chẩn đoán bệnh bằng cách phân lập vi khuẩn từ vết thương và máu. Do *V. vulnificus* gây bệnh đe dọa mạng sống, nên cần nhanh chóng điều trị ngay bằng kháng sinh. Nhóm tetracycline hay nhóm aminoglycoside là những kháng sinh được lựa chọn cho điều trị bệnh này. Bệnh được phòng ngừa bằng cách tránh ăn thủy sản dạng sống hoặc chưa nấu chín đủ.

59.3.5.3. Xác định và đếm *V. vulnificus*

Có hai quy trình dùng để phân lập và đếm *V. vulnificus*. Trước tiên là phân tích theo MPN cùng với đó sử dụng các phép thử sinh hóa cho các chủng phân lập nghi ngờ, lai khuẩn lạc với mẫu dò DNA hay chạy PCR. Quy trình thứ hai gồm phương pháp cấy trực tiếp lên hai đĩa tiến hành lai với mẫu dò DNA để xác định khuẩn lạc. Sử dụng kỹ thuật sắc ký khí để xác định acid béo cũng là phương pháp được sử dụng để xác định *V. vulnificus*.

Mồi cho PCR là *vvhA* hoặc mẫu dò gắn dig dùng để đếm vi khuẩn được sử dụng để khuếch đại đoạn DNA có vị trí base 785 đến 1303 của gen cytolysin, sản phẩm khuếch đại có kích thước 519 bp. Trình tự mồi như sau: mồi xuôi: Vvh-785F: 5' ccg cgg tac agg ttg gcg ca 3', mồi ngược Vvh-1303R: 5'cgc cac cca ctt tcg ggc c 3'

59.4. Các loài *Vibrio* khác

Các loài *Vibrio* khác đôi khi gây bệnh ở người gồm *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio damsela* và *Vibrio hollisae* thường

phát hiện ở những vùng nước lợ thuộc duyên hải, trầm tích và đời sống ở biển thuộc vùng cửa sông. Các loài này là thành phần vi khuẩn bình thường trong môi trường và thường xuất hiện theo mùa.

Các loài *Vibrio* này liên quan đến bệnh ở người như: chứng viêm dạ dày ruột, nhiễm trùng vết thương và du khuẩn huyết. *Vibrio metschnikovii* hiếm khi gây du khuẩn huyết.