

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*

LẠI VŨ KIM

SỰ LƯU HÀNH VÀ KHẢ NĂNG LY GIẢI
CỦA THỰC KHUẨN THỂ TẢ (VIBRIOPHAGE) Ở MÔI
TRƯỜNG NƯỚC NGOẠI CẢNH TẠI MỘT SỐ TỈNH
MIỀN BẮC VIỆT NAM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y TẾ CÔNG CỘNG

HÀ NỘI – 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*-----

LẠI VŨ KIM

**SỰ LƯU HÀNH VÀ KHẢ NĂNG LY GIẢI CỦA THỰC
KHUẨN THỂ TẢ (VIBRIOPHAGE) Ở MÔI TRƯỜNG NƯỚC
NGOẠI CẢNH TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Y tế công cộng

Mã số: 62.72.03.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y TẾ CÔNG CỘNG

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. TS. Nguyễn Đồng Tú**
- 2. PGS.TS. Đặng Đức Nhu**

HÀ NỘI – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu khoa học của riêng tôi, tất cả các kết quả và số liệu trong luận án do chính tôi thực hiện. Tất cả các số liệu trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên tạp chí khoa học trong nước. Phần còn lại trong luận án chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào khác.

Tác giả của luận án

Lại Vũ Kim

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên tôi muốn bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới TS. Nguyễn Đồng Tú, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, và PGS. TS Đặng Đức Nhu, Khoa Y tế công cộng, Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội là những người thầy hướng dẫn khoa học, đã luôn giúp đỡ tôi, tận tình truyền đạt những kiến thức và kinh nghiệm quý báu để tôi có thể hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các Thầy/Cô trong các Hội đồng khoa học chấm đề cương, chấm các chuyên đề và luận án đã đóng góp nhiều ý kiến quý báu để tôi có thêm kiến thức và hoàn thiện luận án đạt chất lượng tốt hơn.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn chân thành tới Trung tâm Đào tạo và Quản lý Khoa học, Bộ môn Y tế công cộng của Viện. Các Thầy/Cô của Trung tâm và Bộ môn đã hướng dẫn, giúp đỡ tôi từ khi bắt đầu khoá học Nghiên cứu sinh, trong quá trình học tập và đến khi hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc đến các anh chị và các bạn của Phòng thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã luôn quan tâm, giúp đỡ, hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Cuối cùng con xin khắc ghi công ơn sinh thành, nuôi dưỡng, dạy dỗ của cha mẹ hai bên gia đình; sự ủng hộ, động viên, thương yêu, chăm sóc, khích lệ của vợ và các con; các anh, chị, em, đồng nghiệp và bạn bè, những người luôn bên tôi và là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ các đề tài/dự án:

- Đề tài quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (Nafosted) “Nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học dùng trong điều trị và xử lý các nguồn nước nhiễm các chủng vi khuẩn tả đa kháng thuốc” (Mã số: 108.06-2017.04) do TS. Nguyễn Đồng Tú chủ nhiệm.
- Đề tài nhánh “Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học phân tử và đặc tính kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn tả O1, O139 và *V. parahaemolyticus* phân lập từ bệnh nhân tiêu chảy và môi trường nước ngoại cảnh” thuộc dự án “Nghiên cứu nâng cao năng lực nghiên cứu các bệnh truyền nhiễm ở Việt Nam và chuyển giao kỹ thuật, công nghệ: 2020-2025” giữa Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương với Trường Đại học Nagasaki, Nhật Bản do TS. Nguyễn Đồng Tú chủ nhiệm.

MỤC LỤC

Trang phụ bìa	ii
LỜI CẢM ƠN	iii
MỤC LỤC.....	v
CÁC TỪ VIẾT TẮT	x
DANH MỤC BẢNG.....	xii
DANH MỤC HÌNH/SƠ ĐỒ	xiv
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Một số khái niệm liên quan.....	3
1.1.1. Bệnh tả.....	3
1.1.2. Phẩy khuẩn tả	3
1.1.3. Dịch lưu hành	4
1.1.4. Thực khuẩn thể.....	4
1.1.5. Thực khuẩn thể tả	5
1.1.6. Ly giải.....	5
1.1.7. Môi trường.....	5
1.1.8. Môi trường nước ngoại cảnh	6
1.1.9. Nguồn truyền nhiễm.....	6
1.1.10. Đường truyền nhiễm.....	6
1.2. Tổng quan bệnh tả.....	6
1.2.1. Bệnh tả.....	6
1.2.1.1. Phương thức lây truyền	7
1.2.1.2. Tính cảm nhiễm và miễn dịch.....	7
1.2.1.3. Dịch tễ học	7

1.2.1.4. Phòng bệnh tả và vắc xin	9
1.2.1.5. Kháng kháng sinh.....	10
1.2.2. Tình hình dịch tả trên thế giới và Việt Nam	12
1.2.2.1. Tình hình dịch tả trên thế giới.....	12
1.2.2.2. Tình hình dịch tả tại Việt Nam.....	13
1.3. Tình hình nghiên cứu về sự lưu hành của thực khuẩn thể tả	14
1.3.1. Đặc điểm hình thái, cấu trúc của thực khuẩn thể tả	14
1.3.1.1. Thực khuẩn thể tả hình cầu (spherical phages).....	15
1.3.1.2. Thực khuẩn thể tả dạng sợi	18
1.3.2. Sự lưu hành của thực khuẩn thể và thực khuẩn thể tả.....	20
1.3.3.1. Sự lưu hành của thực khuẩn thể	20
1.3.3.2. Sự lưu hành của thực khuẩn thể tả	21
1.4. Tình hình nghiên cứu về khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả	23
1.4.1. Các phương pháp phát hiện và đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả.....	23
1.4.1.1. Phương pháp phân lập thực khuẩn thể tả từ mẫu nước.....	23
1.4.1.2. Phương pháp phân lập filamentous phage	23
1.4.1.3. Phương pháp xác định hình dạng thực khuẩn thể tả dưới kính hiển vi điện tử.....	23
1.4.1.4. Kỹ thuật PCR	23
1.4.1.5. Kỹ thuật Southern blot	23
1.4.1.6. Cách xác định khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả.....	23
1.4.2. Liệu pháp phage	24
1.4.2.1. Liệu pháp phage là gì?	25

1.4.2.2. Áp dụng liệu pháp phage	26
1.4.3. Ứng dụng trong dự phòng, kiểm soát bệnh/dịch tả	32
1.5. Đặc điểm chung địa bàn nghiên cứu	34
CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	36
2.1. Đối tượng, địa điểm, thời gian nghiên cứu	36
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	36
2.1.1.1. Mục tiêu 1:	36
2.1.1.2. Mục tiêu 2:	36
2.1.2. Địa điểm nghiên cứu	36
2.1.2.1. Mục tiêu 1.....	36
2.1.2.2. Mục tiêu 2.....	39
2.1.3. Thời gian nghiên cứu	40
2.1.3.1. Mục tiêu 1.....	40
2.1.3.2. Mục tiêu 2.....	40
2.2.. Phương pháp nghiên cứu	40
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	40
2.2.2. Cỡ mẫu	40
2.2.3. Chọn mẫu	42
2.3. Biến số nghiên cứu.....	45
2.4. Phương pháp thu thập thông tin	48
2.4.1. Mục tiêu 1.....	48
2.4.1. Mục tiêu 2.....	48
2.5. Sai số và các biện pháp khắc phục	50

2.6. Xử lý, phân tích số liệu.....	50
2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.....	51
2.8. Sơ đồ nghiên cứu.....	52
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	53
3.1. Sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoại cảnh tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2018 – 2019.....	53
3.1.1. Một số đặc điểm chung của các mẫu nước ngoại cảnh thu thập	53
3.1.2. Kết quả xét nghiệm mẫu nước, môi gạc tôm bằng phương pháp nuôi cấy phân lập	54
3.1.3. Kết quả xét nghiệm mẫu nước bề mặt, môi gạc tôm bằng phương pháp PCR.....	62
3.2. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong phòng thí nghiệm và trên thực địa cộng đồng ở các môi trường nước khác nhau	70
3.2.1. Kết quả thử nghiệm khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả với một số chủng vi khuẩn tả và vi khuẩn đường ruột khác	70
3.2.2. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể ở các điều kiện pha loãng mật độ	74
3.2.3. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể với các điều kiện pH môi trường khác nhau	75
3.2.4. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể với các điều kiện nhiệt độ môi trường khác nhau.	77
3.2.5. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả đối với nguồn nước ngoại cảnh cộng đồng, năm 2020	78
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN.....	83
4.1. Sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoại cảnh... 83	
4.1.1. Một số đặc điểm chung về mẫu nghiên cứu.....	83

4.1.2. Sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoài cảnh	84
4.2. Khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả trong các điều kiện pH, nhiệt độ, mật độ khác nhau	89
4.2.1. Trong phòng thí nghiệm.....	89
4.2.2. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả ở nguồn nước ngoài cảnh cộng đồng.....	96
4.3. Đề xuất một số biện pháp can thiệp để hạn chế sự bùng phát dịch tả ...	102
KẾT LUẬN	109
1. Sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoài cảnh tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam	109
2. Khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả	109
KHUYẾN NGHỊ.....	111
CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ....	112
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

CÁC TỪ VIẾT TẮT

	Viết đầy đủ tiếng Anh	Giải nghĩa tiếng Việt
ATCC	American Týp Culture Collection	Bộ sưu tập chủng chuẩn Mỹ
Bp	Base pairs	Cặp bazơ
CAZ	Ceftazidime	Kháng sinh Ceftazidime
CIP	Ciprofloxacin	Kháng sinh Ciprofloxacin
CsCl	Ceessi Clorua	
CS	Colistin	Kháng sinh Colistin
CTX	Cefotaxime	Kháng sinh Cefotaxime
CTXΦ	Cholerae Toxin Φ	Độc tố tả Φ
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid	Axit Ethylene diamine tetra acetic
Fs1	Filamentous phage 1	Thực khuẩn thể dạng sợi FS1
Fs2	Filamentous phage 2	Thực khuẩn thể dạng sợi FS2
IMI	mipenem-hydrolyzing βlactamas	Enzyme beta-lactamase ly giải kháng sinh imipenem
IMP	Imipenemase	Enzyme ly giải kháng sinh imipenem
IS	Insert sequence	Trình tự chèn
LB	Luria-Bertani	Môi trường Luria-Bertani nuôi cấy vi khuẩn
MIC	Minimal Inhibitory Concentration	Nồng độ kháng sinh tối thiểu ức chế sự phát triển của vi khuẩn

NAG	Non-agglutinable Vibrios	Chủng phẩy khuẩn không ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu của vi khuẩn tả O1, O139
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia, Hoa Kỳ
NICED	National Institute of Cholera and Enteric Diseases	Viện nghiên cứu Quốc gia về tả và các bệnh đường ruột
OXA	Oxacillinase	Enzyme oxacillinase ly giải carbapenem
OD	Optical density	Mật độ quang học
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi
PLB	Polymycin B	
VPI	Vibrio pathogenicity island	Vùng quy định tính gây bệnh của Vibrio
VNBC	Viable but Nonculturable	Tình trạng sống không hoạt động
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2. 1. Số lượng cặp mẫu nước bề mặt mẫu môi gạc tôm thu thập	42
Bảng 3. 1. Số lượng mẫu nước theo cặp mẫu (mẫu nước bề mặt và mẫu môi gạc tôm) thu thập được trong giai đoạn 2018-2019.....	53
Bảng 3. 2. Tỷ lệ phân bố mẫu nước bề mặt, mẫu môi gạc tôm theo thể loại mẫu, 2018 - 2019.....	53
Bảng 3. 3. Kết quả nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả theo mẫu nước bề mặt, 2018-2019.....	54
Bảng 3. 4. Kết quả nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả theo mẫu môi gạc tôm, 2018-2019.....	55
Bảng 3. 5. Kết quả phân lập thực khuẩn thể tả ở mẫu nước bề mặt theo thời gian, 2018-2019.....	57
Bảng 3. 6. Kết quả phân lập thực khuẩn thể tả ở mẫu môi gạc tôm theo thời gian, 2018-2019.....	58
Bảng 3. 7. Kết quả xét nghiệm thực khuẩn thể tả dạng sợi trong mẫu nước bề mặt bằng PCR, 2018-2019	62
Bảng 3. 8. Kết quả xét nghiệm thực khuẩn thể tả dạng sợi trong mẫu gạc tôm bằng PCR, 2018-2019	63
Bảng 3. 9. Kết quả xét nghiệm PCR mẫu nước bề mặt theo thời gian, 2018-2019	64
Bảng 3. 10. Kết quả xét nghiệm PCR mẫu môi gạc tôm theo thời gian, 2018-2019	65
Bảng 3. 11. Kết quả phát hiện thực khuẩn thể tả theo phương pháp xét nghiệm	69
Bảng 3. 12. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả với một số chủng vi khuẩn tả	70

Bảng 3. 13. Thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể với một số loại vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy khác	73
Bảng 3. 14. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể ở các điều kiện pha loãng khác nhau	74
Bảng 3. 15. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể với các điều kiện pH môi trường khác nhau	75
Bảng 3.16. Kết quả thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau	77
Bảng 3.17. Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong môi trường nước máy, năm 2020	78
Bảng 3.18. Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong môi trường nước sông/suối, năm 2020.....	78
Bảng 3. 19. Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong môi trường nước giếng, năm 2020	79
Bảng 3. 20. Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong môi trường nước mưa, năm 2020.....	80
Bảng 3. 21. Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong môi trường nước ao/hồ, năm 2020	80

DANH MỤC HÌNH/SƠ ĐỒ

Hình 1. 1. Hình ảnh Myoviridae quan sát dưới kính hiển vi điện tử	16
Hình 1. 2. Hình ảnh Siphoviridae quan sát dưới kính hiển vi điện tử	17
Hình 1. 3. Hình ảnh Podoviridae dưới kính hiển vi điện tử.....	18
Hình 1. 4. Hình ảnh kappa phage gắn vào các gen nối giữa flaA và flaC của vi khuẩn tả O1 và O139.....	19
Hình 1. 5. Hình ảnh đại diện của filamentous phage	20
Hình 1. 6. Hình vết tan (plaque) để phát hiện thực khuẩn thể MJ1	24
Hình 1. 7. Hình ảnh vết tan của thực khuẩn thể tả tại Hải Phòng và Thái Bình năm 2007-2008	24
Sơ đồ 2. 1. Vị trí lấy mẫu tại Nam Định	38
Sơ đồ 2. 2. Vị trí lấy mẫu tại Thái Bình.....	38
Sơ đồ 2. 3. Vị trí lấy mẫu tại Hải Phòng.....	39
Sơ đồ 2. 4. Vị trí lấy mẫu tại Hà Nội	39
Sơ đồ 4. 1. Sơ đồ giám sát cảnh báo dịch tả dựa trên xét nghiệm mẫu nước ngoài cảnh	104

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 1. 1. Mối liên quan giữa các loại vi khuẩn và môi trường ngoại cảnh	9
Biểu đồ 1.2. Tình hình dịch tả và tiêu chảy cấp tính trên toàn cầu đến 01/2/2023	12
Biểu đồ 1.3. Các ca bệnh tả trên toàn cầu được báo cáo từ 1989-2021	13
Biểu đồ 3. 1. Kết quả nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả theo loại mẫu thu thập, 2018-2019.....	59
Biểu đồ 3. 2. Kết quả nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả theo chủng chi thị, 2018-2019.....	60
Biểu đồ 3. 3. Kết quả nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả theo thời gian, 2018-2019	61
Biểu đồ 3. 4. Kết quả PCR thực khuẩn thể tả theo loại nguồn mẫu nước thu thập, 2018-2019.....	66
Biểu đồ 3. 5. Kết quả PCR thực khuẩn thể tả theo chủng, 2018-2019	67
Biểu đồ 3. 6. Kết quả PCR thực khuẩn thể tả theo thời gian, 2018-2019.....	68
Biểu đồ 3. 7. Kết quả xét nghiệm thực khuẩn thể tả theo thời gian, 2018-2019	69
Biểu đồ 3. 8. Kết quả thử nghiệm khả năng ly giải của thực khuẩn thể VP04 đối với các nguồn nước ngoại cảnh cộng đồng, năm 2020.....	81

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tả là một hội chứng lâm sàng – dịch tễ gây ra bởi chủng vi khuẩn tả nhóm O1 hoặc O139 được ghi nhận lần đầu tiên năm 1817 tại đồng bằng sông Hằng của tiểu lục địa Ấn Độ. Từ khi phát hiện ra bệnh tả, trên thế giới đã xảy ra 07 vụ đại dịch. Dịch tả đã trở thành một bệnh dịch nguy hiểm và bắt buộc phải báo cáo toàn cầu [6].

Dự phòng và điều trị bệnh tả bằng vắc xin tiêm (từ năm 1880) và nay được thay thế bằng vắc-xin tả uống là một biện pháp dự phòng được sử dụng phổ biến hiện nay. Sử dụng kháng sinh để điều trị tả là một biện pháp quan trọng; tuy nhiên, ngày càng xuất hiện nhiều báo cáo về tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn tả đối với các loại kháng sinh thông thường; ngay cả nhóm quinolone - một nhóm kháng sinh rất có hiệu quả trong điều trị tả cũng đã được báo cáo bị vi khuẩn tả kháng thuốc [11], [15].

Ở Việt Nam, bệnh tả được ghi nhận là nguyên nhân gây tiêu chảy hàng đầu từ hơn một thế kỷ qua với nhiều đợt dịch xảy ra trong lịch sử. Mặc dù đã có nhiều thành tựu trong phòng và điều trị bệnh tả nhưng tỷ lệ mắc tả có những diễn biến bất thường, không theo quy luật. Năm 2007, dịch tiêu chảy cấp bùng phát đầu tiên ở thủ đô Hà Nội sau đó lan ra 13 tỉnh, thành phố phía Bắc. Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã phân lập được phẩy khuẩn tả trong nước cống, nước hồ quanh nhà người bệnh ... Điều đó chứng tỏ vi khuẩn tả đã có mặt trong môi trường nước ở khu vực dân cư qua đó làm ô nhiễm nguồn nước và các loại thực phẩm [18], [17].

Trong điều kiện xuất hiện nhiều chủng vi khuẩn kháng với nhiều loại kháng sinh kể cả các kháng sinh thế hệ mới, các nhà nghiên cứu bắt đầu nghiên cứu trở lại về thực khuẩn thể (bacteriophage) [75]. Thực khuẩn thể là vi rút đặc biệt bao gồm 02 nhóm: thực khuẩn thể tan (lytic) và tiềm tan (lysogenic) và lưu hành rộng rãi trong tự nhiên với số lượng lớn [85], [46], [64]. Nghiên cứu sự lưu hành của

thực khuẩn thể tả trong môi trường nước có ý nghĩa quan trọng trong giám sát môi trường, phát hiện và định tít chủng tả qua đó góp phần kiểm soát bệnh tả [61], [89]. Liệu pháp thực khuẩn thể với đặc trưng là khả năng ly giải của thực khuẩn thể đối với vi khuẩn đặc hiệu đã được nghiên cứu từ đầu thế kỷ 19. Trong nghiên cứu tỷ lệ thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoại cảnh và mối liên quan của chúng với vi khuẩn tả ở Calcutta (Ấn Độ), các nhà khoa học đã nhận thấy tỷ lệ mắc và tử vong cao của bệnh nhân mắc tả đầu vụ dịch đã giảm nhanh chóng khi thực khuẩn thể tả được phân bố rộng rãi trong môi trường ngoại cảnh. Tuy nhiên, việc nghiên cứu thực khuẩn thể ít được quan tâm khi có sự xuất hiện của nhiều loại kháng sinh. Tại các nước phát triển thực khuẩn thể đã và đang được sử dụng hiệu quả trong công nghệ sinh học hiện đại, bên cạnh đó thực khuẩn thể còn được biết đến như một loại vi sinh vật có vai trò dự báo dịch; chẩn đoán các vi khuẩn gây bệnh và tham gia vào sản xuất vắc xin [19].

Việc lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoại cảnh có ý nghĩa thế nào trong việc phát hiện, cảnh báo nguy cơ bùng phát dịch tả và có thể sử dụng chủng thực khuẩn thể tả nào tại Việt Nam để xử lý nguồn nước ô nhiễm cũng như không chế vi khuẩn tả đối với các chủng tả đa kháng thuốc? Để nghiên cứu sự lưu hành, tiến hành phân lập cũng như đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả ở môi trường nước ngoại cảnh tại những tỉnh đã từng xảy ra dịch tả ở miền Bắc Việt Nam, chúng tôi triển khai nghiên cứu đề tài: ***“Sự lưu hành và khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả (Vibriophage) ở môi trường nước ngoại cảnh tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam”***.

Với các mục tiêu như sau:

Mục tiêu 1: Mô tả sự lưu hành của thực khuẩn thể tả (*Vibriophage*) trong môi trường nước ngoại cảnh tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2018-2019.

Mục tiêu 2: Đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong phòng thí nghiệm và trên thực địa cộng đồng ở các môi trường nước khác nhau.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Một số khái niệm liên quan

1.1.1. Bệnh tả

Bệnh tả là một hội chứng lâm sàng - dịch tễ gây ra bởi phẩy khuẩn tả (*Vibrio cholerae*). Một ca bệnh tả nặng điển hình có đặc điểm đi ngoài phân nhiều nước, màu phân giống như nước vo gạo và nhanh chóng dẫn đến tình trạng mất nước. Bệnh tả hiện nay vẫn còn xảy ra tại nhiều nơi trên thế giới. Theo số liệu của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), còn khoảng 36 nước vẫn còn có bệnh tả. Bệnh tả nếu không được điều trị kịp thời và đúng cách thường có tỷ lệ mắc/chết rất cao, khoảng 40%. Mỗi năm ước tính có trung bình khoảng 1 triệu trường hợp bị mắc bệnh tả, số tử vong là khoảng 200.000 ở châu Phi và khoảng 100.000 ở châu Á. Một phần ba số tử vong đó là trẻ em dưới 05 tuổi, một phần tư là trẻ em từ 5-14 tuổi, và số còn lại là người lớn [6].

Theo Quyết định số 4283/QĐ-BYT ngày 08/8/2016 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành tài liệu “Định nghĩa trường hợp bệnh truyền nhiễm”[5] thì bệnh tả là bệnh truyền nhiễm thuộc nhóm A trong Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm năm 2007. Một trường hợp bệnh tả xác định được định nghĩa như sau:

“Là trường hợp bệnh nghi ngờ hoặc trường hợp bệnh có thể, có ít nhất một trong các kết quả xét nghiệm sau:

*- Phân lập được phẩy khuẩn tả *V. cholerae* nhóm huyết thanh 01 hoặc 0139 từ mẫu phân hoặc chất nôn của bệnh nhân tiêu chảy cấp, hoặc*

- Xác định được đoạn gen đặc hiệu của vi khuẩn tả bằng kỹ thuật sinh học phân tử”.

1.1.2. Phẩy khuẩn tả

Phẩy khuẩn tả (*Vibrio cholerae*) là vi khuẩn hình cong dấu phẩy, không bắt màu gram, không sinh nha bào, di động nhanh nhờ có một lông. Phẩy khuẩn

tả dễ nuôi cấy trong môi trường nghèo dinh dưỡng, pH kiềm (pH từ 8,5-9,0) và mặn.

Phẩy khuẩn tả có khoảng 140 nhóm huyết thanh đã được xác nhận, nhưng chỉ có nhóm huyết thanh O là gây được bệnh tả. Phẩy khuẩn tả được chia thành vi khuẩn tả O1 và không O1 (vi khuẩn tả không ngưng kết với O1 còn được gọi là chủng NAG). Vi khuẩn tả gồm 2 týp sinh học (biotype) là vi khuẩn tả cổ điển và vi khuẩn tả El tor. Mỗi týp sinh học lại được chia thành các týp huyết thanh như Ogawa, Inaba và Hikojima. Vi khuẩn tả cổ điển được Robert Koch phát hiện năm 1883 và là nguyên nhân gây ra 6 vụ đại dịch tả trên thế giới từ 1816-1926. Vi khuẩn tả El tor do Gotschlich tìm ra năm 1905 ở khu vực El tor – Ai Cập, đây là nguyên nhân gây ra đại dịch tả lần thứ 7 bắt đầu từ 1961 đến nay. Từ cuối năm 1992, chủng tả O139 lần đầu tiên được phát hiện trong một vụ dịch tả lớn ở miền nam Ấn Độ và Bangladesh (trong 3 tháng có 100.000 người mắc). Đến cuối năm 1994, người ta cũng đã phát hiện ra vi khuẩn tả O139 trong một vài vụ dịch tả ở một số nơi khác (Pakistan, Nepal, Malaysia, Thái Lan, và miền tây Trung Quốc) [7]

1.1.3. Dịch lưu hành

Là dịch luôn có ở địa phương hay một nhóm dân số nào đó với tỷ suất hiện mắc và tỷ suất mới mắc tương đối cao so với địa phương, nhóm dân số khác [1].

1.1.4. Thực khuẩn thể

Thực khuẩn thể (Bacteriophage) thường gọi tắt là phage, được Twort phát hiện năm 1915 và d'Herelle đặt tên là "*bacteriophage*" năm 1917. Bacteriophage được ghép bởi "*bacterium*" (vi khuẩn) và "*phagein*" (ăn, nuốt) hay là thực khuẩn thể là vi rút mà tế bào cảm thụ là vi khuẩn, nghĩa là nó có khả năng ly giải vi khuẩn, do đó người ta còn gọi thực khuẩn thể là vi rút của

vi khuẩn [126].

1.1.5. Thực khuẩn thể tả

Thực khuẩn thể tả (*Vibriophage*) là vi rút có khả năng ly giải vi khuẩn thuộc họ Vibrionaceae. Những vi rút này đại diện cho một nhóm vi rút dị dưỡng đa dạng về mặt di truyền và trao đổi chất, có mặt khắp nơi trong các đại dương. Chúng có thể sống tự do, tuy nhiên, chúng có nhiều hơn trong trầm tích hoặc kết hợp với các sinh vật biển hoặc các hạt hữu cơ khác. Hơn nữa, nhóm này bao gồm một số mầm bệnh, bao gồm *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. harvey* và *V. vulnificus*. Những mầm bệnh này lây nhiễm sang hơn 50 loài cá, động vật thân mềm và động vật giáp xác. Chúng có thể gây ra bệnh Vibriosis, một căn bệnh ác tính ảnh hưởng đến ngành nuôi trồng thủy sản trên toàn cầu và gây ngộ độc thực phẩm ở những người tiêu thụ hải sản sống bị nhiễm bệnh. Kết quả là, các thể thực khuẩn tiêu hủy được đặc biệt quan tâm do tiềm năng sử dụng của chúng trong liệu pháp thể thực khuẩn, như là phương pháp điều trị bệnh Vibriosis [127]

1.1.6. Ly giải

Ly giải hay chu trình tan (lytic cycle) của thực khuẩn thể (phage) là chu trình phân rã vi khuẩn và phóng thích phage trưởng thành. Bắt đầu là phage bám vào vách tế bào vi khuẩn và phân giải nhờ hệ thống enzyme để xâm nhập vào bên trong, phá hủy ADN tế bào vi khuẩn. Tiếp theo là quá trình sinh tổng hợp, tạo ra các tiểu thể vi rút mới, làm phân rã vi khuẩn và phóng thích các phage trưởng thành. Các phage có khả năng phân rã vi khuẩn trong thời gian ngắn gọi là phage độc, là tác nhân diệt khuẩn chính xác, đặc hiệu và không ảnh hưởng đến vi khuẩn không phải vật chủ.

1.1.7. Môi trường

Theo khoản 1, Điều 3, Luật Bảo vệ môi trường số 72/2020/QH14 ngày 17/11/2020 của Quốc hội, có hiệu lực kể từ ngày 01/01/2022 thì môi trường

bao gồm các yếu tố vật chất tự nhiên và nhân tạo quan hệ mật thiết với nhau, bao quanh con người, có ảnh hưởng đến đời sống, kinh tế, xã hội, sự tồn tại, phát triển của con người, sinh vật và tự nhiên [16]

1.1.8. Môi trường nước ngoại cảnh

Trong nghiên cứu này, môi trường nước ngoại cảnh được hiểu là nước bề mặt tại các nguồn nước: nước sông, suối; nước ao, hồ, đầm; nước giếng; nước máy; nước mưa.

1.1.9. Nguồn truyền nhiễm

Là tác nhân gây ra các bệnh truyền nhiễm bao gồm vi khuẩn, vi rút hoặc vi sinh vật [42].

Nguồn truyền nhiễm có thể là người bệnh, người mang trùng, hay động vật. Một tiêu điểm dịch hay ổ dịch trong cộng đồng hay một ổ dịch trong thiên nhiên có thể là điểm khởi phát của nhiễm trùng [1].

1.1.10. Đường truyền nhiễm

Cơ chế truyền nhiễm của một bệnh nhiễm trùng đặc trưng bằng đường truyền nhiễm với lối ra của tác nhân gây bệnh khởi ký chủ và lối vào của tác nhân đó ở ký chủ mới, cùng với phương thức tồn tại của tác nhân ở bên ngoài cơ thể ký chủ. Các yếu tố truyền nhiễm như: không khí, đất, nước, thực phẩm, tiết túc có vai trò trung gian trong một khoảng thời gian nào đó giúp vi sinh vật gây bệnh sống sót khi ra khỏi cơ thể ký chủ và đưa vi sinh vật gây bệnh xâm nhập vào cơ thể ký chủ mới [1].

1.2. Tổng quan bệnh tả

1.2.1. Bệnh tả

Phẩy khuẩn tả (*V. cholerae*) là tác nhân gây bệnh tả bằng bằng độc tố ruột. Độc tố ruột gắn vào niêm mạc ruột non, hoạt hoá enzyme adenylcyclase dẫn đến tăng AMP vòng, làm giảm hấp thu Na^+ , tăng tiết Cl^- và nước gây tiêu

chảy cấp tính. Phẩy khuẩn tả dễ bị tiêu diệt bởi nhiệt độ ($80^{\circ}\text{C}/5$ phút), bởi hoá chất (Clo 01mg/lít) và môi trường axit. Tình trạng thời tiết khô hanh, ánh nắng mặt trời cũng có thể làm chết phẩy khuẩn tả. Phẩy khuẩn tả có thể tồn tại lâu trong phân, đất ẩm, nước, thực phẩm [7].

1.2.1.1. Phương thức lây truyền

Nước là yếu tố lây truyền dịch tả; phẩy khuẩn tả theo nước bị nhiễm bản bởi phân người hoặc phân động vật và qua thực phẩm bị nhiễm các tác nhân gây bệnh trong quá trình chế biến hoặc bảo quản, bởi nước bẩn, qua bàn tay bẩn và ruồi, nặng nhiễm phẩy khuẩn tả. Những yếu tố làm tăng nguy cơ lan truyền bệnh tả là đời sống kinh tế xã hội và dân trí thấp, phong tục tập quán sinh hoạt lạc hậu, thời tiết nóng ẩm, thiếu nước sạch và nhà tiêu hợp vệ sinh, không đảm bảo các điều kiện về vệ sinh an toàn thực phẩm đặc biệt là thức ăn đường phố, tình trạng mất vệ sinh ở những vùng sau lũ lụt, thảm họa, trại tị nạn [7], [6].

1.2.1.2. Tính cảm nhiễm và miễn dịch

Phẩy khuẩn tả chỉ gây bệnh ở người. Mọi lứa tuổi đều có thể mắc bệnh tả. Tuy nhiên, tính cảm nhiễm bệnh phụ thuộc vào mỗi cá thể và liều nhiễm khuẩn. Cơ thể sau khi mắc bệnh hoặc nhiễm khuẩn không triệu chứng đều có miễn dịch đặc hiệu với chủng tả gây bệnh có thể đến 3 năm. Nhìn chung, miễn dịch thu được trong bệnh tả là vững chắc nhưng không lâu bền như trong thương hàn và sởi. Không có miễn dịch chéo giữa các chủng phẩy khuẩn tả nhóm O1 và O139, giữa các týp huyết thanh (Ogawa và Inaba), giữa các týp sinh học (cổ điển và El tor) [7].

1.2.1.3. Dịch tễ học

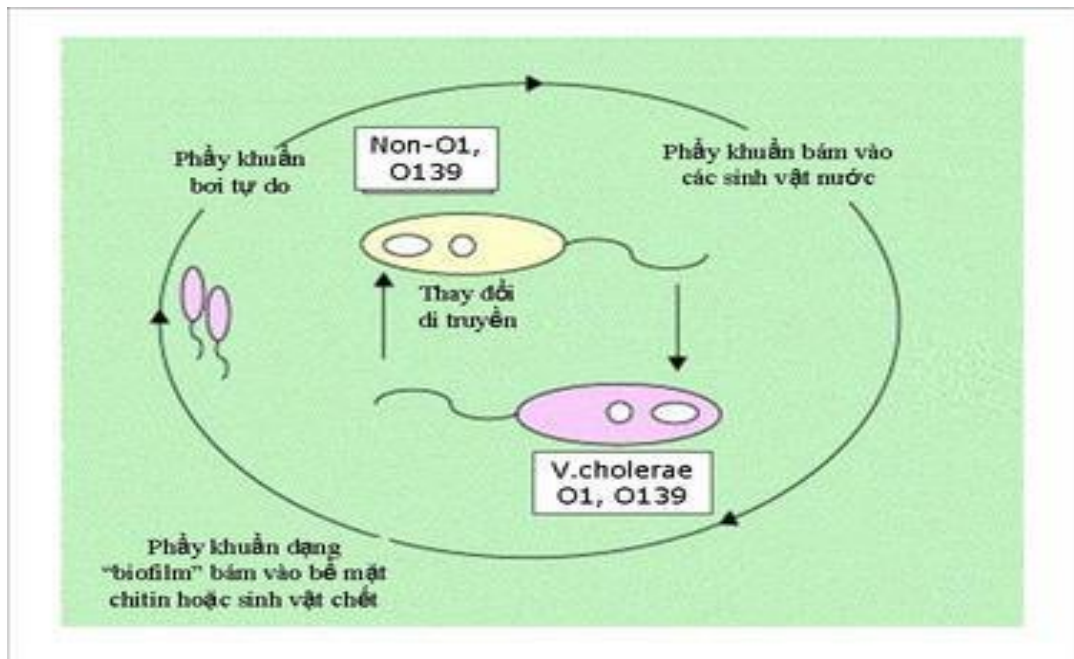
a. Nguồn truyền nhiễm

Người bệnh và người lành mang vi khuẩn tả là nguồn truyền nhiễm chủ yếu. Vi khuẩn tả tìm thấy chủ yếu trong phân người bệnh, ít tìm thấy trong chất

nôn. Phân của người bệnh gây ô nhiễm thức ăn, nước uống, các vật dụng, bàn tay, từ đó lây lan từ người này sang người khác qua đường tiêu hóa [12]. Người lành mang vi khuẩn gồm người nhiễm khuẩn không triệu chứng và người khỏi bệnh mang vi khuẩn tả. Người nhiễm tả không triệu chứng là nguồn truyền nhiễm nguy hiểm, làm lây lan bệnh từ địa phương này tới địa phương khác và làm dịch lan rộng từ một nước ra nhiều nước [10].

Vi khuẩn tả có thể tồn tại trong nhiều loại động vật sống ở các vùng nước ngọt, nước lợ và nước mặn, đặc biệt là trong tôm, cua, ốc, hến, sò .v.v. Một số nghiên cứu cho thấy sự tồn tại ở chứa vi khuẩn tả ngoài môi trường ở các động vật thủy sinh, các sinh vật phù du sống trong vùng nước cửa sông [10].

Trong 20 năm qua, những nghiên cứu ở Australia và Mỹ đã chứng minh cả hai loại chủng vi khuẩn tả O1 không sinh độc tố và sinh độc tố là những thành viên của hệ sinh thái nước. Vi khuẩn tả O1 trong môi trường ngoại cảnh dễ bị ly giải khi gặp điều kiện không thuận lợi hoặc dạng sống nhưng không thể nuôi cấy được (Viable but non culture – VNBC), khi gặp điều kiện thuận lợi có thể gây dịch. Tình trạng VNBC có thể giải thích một phần tính chất ngắt quãng của các vụ dịch tả, trong điều kiện có ít chất dinh dưỡng, các tế bào vi khuẩn gram âm trong đó có vi khuẩn tả trải qua những thay đổi hình thể, nhỏ đi và chuyển thành hình cầu. Một số nghiên cứu của các tác giả cũng đề cập đến những thay đổi về hình thể tế bào của vi khuẩn tả [49], [59], [69].



Biểu đồ 1. 1. Mối liên quan giữa các loại vi khuẩn và môi trường ngoại cảnh [83]

b. Đường truyền nhiễm

Nước là yếu tố lây truyền bệnh chủ yếu trong dịch tễ học bệnh tả đã được John Snow khẳng định năm 1854. Từ đó đến nay đã có nhiều nghiên cứu dịch tễ học khẳng định vai trò quan trọng của nước đối với sự lan truyền dịch tả. Sử dụng nước không hợp vệ sinh và không được khử trùng đóng vai trò chủ yếu trong lan truyền bệnh tả. Kết quả điều tra các mẫu nước trong khu vực đang có dịch như ở Bangladesh cho thấy có 12% mẫu nước có vi khuẩn tả O139 và 1% mẫu nước có vi khuẩn tả O1. Vi khuẩn tả có trong môi trường nước chủ yếu là do nhiễm phân của bệnh nhân tả [6], [60].

1.2.1.4. Phòng bệnh tả và vắc xin

Phòng bệnh tả:[132] Tuyên truyền giáo dục cộng đồng trên các phương tiện thông tin đại chúng các kiến thức về bệnh tả và tiêu chảy cấp, các biện pháp thực hành vệ sinh cá nhân, vệ sinh môi trường; an toàn vệ sinh thực phẩm; bảo vệ nguồn nước và dùng nước sạch; khi có người bị tiêu chảy cấp, nhanh chóng

báo cáo cho cơ sở y tế gần nhất để được hướng dẫn và điều trị kịp thời; (2) Tăng cường cung cấp nước sạch và vệ sinh môi trường; (3) Tăng cường việc thanh kiểm tra an toàn vệ sinh thực phẩm, đặc biệt là tại các cơ sở chế biến thực phẩm, chợ, nhà hàng, bếp ăn tập thể, trường học, thức ăn đường phố...; (4) Duy trì thường xuyên việc giám sát các trường hợp tiêu chảy cấp, đặc biệt chú ý các vùng trọng điểm và vào mùa dịch, kịp thời phát hiện các ca bệnh đầu tiên; (5) Luôn sẵn sàng có đội cơ động phòng chống dịch ở từng tuyến. Chuẩn bị các cơ sở dự trữ cho chống dịch tả; (6) Gây miễn dịch chủ động bằng vắc xin [7].

Vắc xin phòng bệnh tả: WHO chính thức khuyến nghị sử dụng vắc xin tả trong những khu vực khẩn cấp (thiên tai, dịch họa) như là biện pháp y tế công cộng hỗ trợ cho các biện pháp phòng bệnh như cải thiện hệ thống cấp nước hợp vệ sinh và giáo dục sức khỏe. Cần tiến hành song song với các biện pháp tăng cường giám sát và cảnh báo sớm [7].

Tuy nhiên, theo Lopez và cộng sự (2014), vắc xin tả đường uống không nên được coi là biện pháp phòng ngừa duy nhất trong việc kiểm soát bệnh tả tách biệt khỏi các biện pháp khác [25].

1.2.1.5. Kháng kháng sinh

Kháng sinh dùng cho điều trị tả có tác dụng rút ngắn quá trình bệnh và rút ngắn thời gian đào thải vi khuẩn qua đường phân. Nhóm quinolon thế hệ mới như norfloxacin và ciprofloxacin có tác dụng rất tốt trong thực tế điều trị bệnh tả [6].

Tuy nhiên, theo Phùng Đức Cam, tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn tả ngày một tăng, gen kháng thuốc nằm ở Plasmid IncC. Việc kháng thuốc không chỉ xảy ra ở tetracyclin mà còn đối với chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazol [6]. Kết quả cho thấy phẩy khuẩn tả đã kháng mức độ vừa với tetracycline và chloramphenicol; kháng ở mức độ mạnh với sulfamethoxazole-trimethoprim [56].

Nguyễn Thị Đầu và cộng sự (2015) đã nghiên cứu sự nhạy cảm và đề kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn tả phân lập được tại tỉnh Trà Vinh thì thấy rằng vi khuẩn tả kháng với vancomycin (67%), steptomycin (50%), tetracycline (33%) [11].

Nghiên cứu về kháng kháng sinh của vi khuẩn tả phân lập được ở miền Bắc Việt Nam từ năm 2007 đến 2010 thấy rằng vi khuẩn tả kháng tetracycline (29%), nhạy cảm với chlorampenicol (100%) [146].

Kết quả nghiên cứu của Devarati Dutta và cộng sự (2013) cho thấy hầu hết những chủng không ngưng kết (NAG) đều đề kháng với nalidixic acid (57.6%), ampicillin (55.5%); nhạy cảm với gentamicin (96%), tetracycline (80%) và chloramphenicol (80.4%) [55].

Brain (2011) cho rằng kháng kháng sinh là vấn đề lớn đối với việc phòng, chống bệnh tả do chưa có nhóm kháng sinh mới được phát triển và do đó ngày càng có nhu cầu về một giải pháp thay thế kháng sinh [35]. Theo Barrow (2001), Matsuzaki Uchiyama và cộng sự (2014), một phương pháp điều trị thay thế như vậy là kiểm soát vi khuẩn tả bằng cách sử dụng thể thực khuẩn đặc hiệu đối với vật chủ [28], [95]. Không giống kháng sinh phổ rộng có tác dụng tiêu diệt các vi khuẩn có lợi trong đường ruột, thể thực khuẩn chỉ tiêu diệt vi khuẩn mục tiêu. Nghiên cứu của Weinbauer (2004) cho thấy các thực khuẩn thể tan (lytic) hạn chế số lượng vi khuẩn trong môi trường nước lên tới 80% [153]. Các nghiên cứu của Faruque, Islam và cộng sự (2005), Jensen, Faruque và cộng sự (2006), Nelson, Chowdhury và cộng sự (2008) cho thấy bằng chứng về việc vi khuẩn tả trong môi trường nước được kiểm soát bởi các thực khuẩn thể tả tan [58], [78], [107].

Các báo cáo trước đây của Asheshow, Saranjam và cộng sự (1930), Morison (1932), Monsur, Rahman và cộng sự (1970), Marcuk, Nikiforov và cộng sự (1971) về việc sử dụng liệu pháp thể thực khuẩn với bệnh tả cho thấy

có sự thành công nhất định [26], [99], [98], [94].

1.2.2. Tình hình dịch tả trên thế giới và Việt Nam

1.2.2.1. Tình hình dịch tả trên thế giới

Theo báo cáo của WHO, năm 2021 có 23 quốc gia báo cáo dịch tả bùng phát, chủ yếu ở khu vực Châu Phi và Đông Địa Trung Hải. Năm 2022, có 30 quốc gia trên 5 trong số 6 khu vực trên thế giới báo cáo các trường hợp mắc bệnh tả hoặc bùng phát dịch tả; trong đó có 14 quốc gia không báo cáo năm 2021. Tính đến ngày 01/02/2023, có ít nhất 18 quốc gia tiếp tục báo cáo các trường hợp mắc tả. Theo mô hình thời vụ, phần lớn các quốc gia có trường hợp mắc tả hiện đang trong giai đoạn lây truyền thấp hoặc giữa các đợt dịch. Tỷ suất chết thô (Crude fatality rate – CFR) tại nhiều quốc gia báo cáo cao hơn những năm trước. Tỷ lệ CFR được báo cáo trên toàn cầu năm 2021 là 1,9% (2,9% ở Châu Phi) [161].

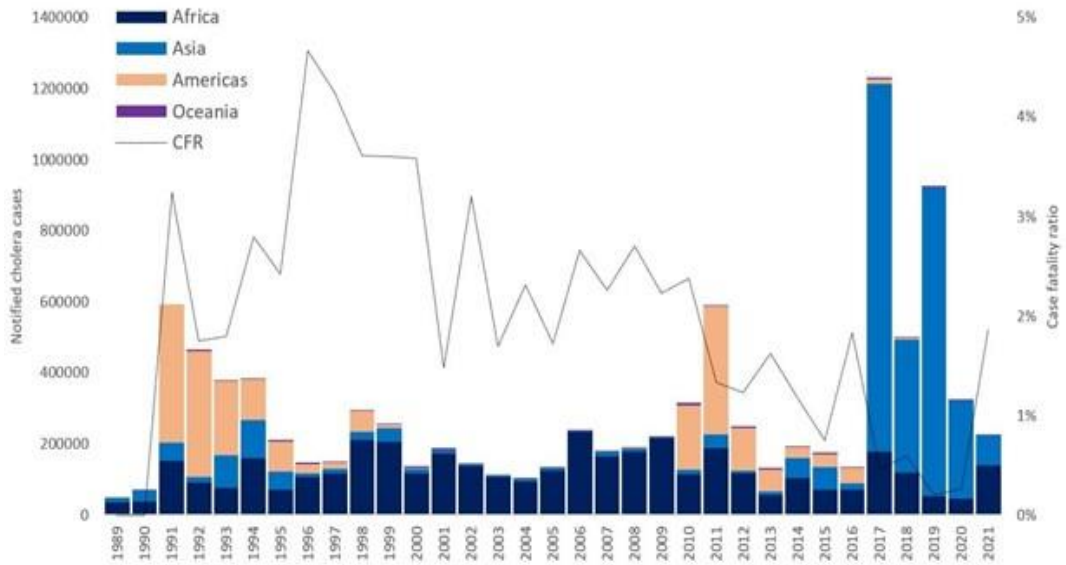


The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of WHO concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: World Health Organization
Map Production: WHO Health Emergencies Programme
Map Date: 3 February 2023

 **World Health Organization**
© WHO 2023. All rights reserved.

Biểu đồ 1.2. Tình hình dịch tả và tiêu chảy cấp tính trên toàn cầu đến 01/2/2023 [161]



Biểu đồ 1.3. Các ca bệnh tả trên toàn cầu được báo cáo từ 1989 – 2021 [161]

1.2.2.2. Tình hình dịch tả tại Việt Nam

Bệnh tả lần đầu tiên xuất hiện ở Việt Nam năm 1850 với 2 triệu trường hợp bệnh được thông báo. 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 năm 1964 với 20.009 người mắc bệnh trong đó 821 người tử vong. Từ đó 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 bệnh nhân. 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 [7].

1.3. Tình hình nghiên cứu về sự lưu hành của thực khuẩn thể tả

Thực khuẩn thể tả (*Vibriophage*) được Felix'd Herelle phát hiện đầu tiên vào những năm 1920 [143]. Tuy nhiên, trước đó 20 năm, Ernest Hankin, nhà sinh vật học người Anh phát hiện thấy có 1 nguồn chưa xác định rõ có khả năng chống lại vi khuẩn tả trên sông Ganges và Jumne tại Ấn Độ. Năm 1919, Felix'd Herelle đã sử dụng thực khuẩn thể để kiểm soát quần thể vi khuẩn và sự lây lan của các bệnh truyền nhiễm. Ông và cộng sự đã thực hiện liệu pháp thể thực khuẩn ở nhiều nước trên thế giới với những nỗ lực lớn ở Ấn Độ, Ai Cập, Hoa Kỳ và Liên Xô. Nhiễm khuẩn đã được khống chế thành công khi sử dụng liệu pháp thể thực khuẩn của các vi khuẩn *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella*, *V. cholerae*, *Pseudomonas* và *Proteus* [53], [52], [139].

1.3.1. Đặc điểm hình thái, cấu trúc của thực khuẩn thể tả

Phân loại thực khuẩn thể tả chủ yếu dựa vào hình thái bên ngoài. Có hai nhóm chính đó là: thực khuẩn thể hình cầu và thực khuẩn thể gắn vào filamentous.

Các thực khuẩn thể tả đến các vị trí thụ thể đặc hiệu trên thành tế bào vi khuẩn. Ở các vi khuẩn gram (-) các thụ thể được phát hiện là các protein và lipopolysaccharide cấu tạo nên màng ngoài bao quanh lớp vỏ peptidoglycan. Các thực khuẩn thể tả sẽ đến gắn vào các vị trí đặc hiệu của tế bào vi khuẩn. Các thực khuẩn thể tả chỉ hoạt động đặc hiệu trên các tế bào vi khuẩn đích của nó [48] các thực khuẩn thể tả khác nhau sẽ được gắn vào các vị trí khác nhau của tế bào vi khuẩn. Do vậy, trên bề mặt tế bào vi khuẩn có nhiều dạng thụ thể khác nhau, mỗi dạng thụ thể được gắn nhiều các bản sao của thực khuẩn thể tả [123].

Thực khuẩn thể tả có 2 dạng:

- (1) Thực khuẩn thể tả hình cầu.
- (2) Thực khuẩn thể tả dạng sợi.

1.3.1.1. Thực khuẩn thể tả hình cầu (*spherical phages*)

Thực khuẩn thể tả hình cầu được phân theo 3 họ chính:

- *Myoviridae*
- *Siphoviridea*
- *Podoviridae*

Đặc tính của thực khuẩn thể tả là các hạt virion, chưa phải là vi rút hoàn chỉnh.

a. Họ Myoviridae [128]

- Hình thái: Thực khuẩn thể tả bao gồm một đầu và một đuôi, không có vỏ bao quanh. Phần đầu được nối với đuôi bởi phần cổ rồi đến phức hợp đuôi, phần đuôi bao gồm một ống trung tâm và một vỏ có thể co rút được, nối với một cổ, đĩa cơ bản, 6 gai ngắn và 6 sợi dài. Sự co rút của thực khuẩn thể tả là cần thiết để cung cấp ATP. Thực khuẩn thể tả này có một đuôi dạng xoắn ốc và một đầu với đối xứng hai mươi mặt hoặc đối xứng bất nguồn từ một cấu trúc hai mươi mặt cơ bản thêm vào hàng các đơn vị của lớp vỏ capsid (capsomer) lớp vỏ protein của vi rút (capsid) (T=13). Đầu là dạng đồng phân để kéo dài về hình dạng và có đường kính 50 – 110nm. Lớp vỏ capsid có hình lục lăng bên ngoài, bao gồm 152 đơn vị capsome. Phần đuôi cứng, dài và dày, phần ống co rút được và được ngăn cách bằng dấu chữ thập, hoặc có các vết nhăn có hình dạng các đường dấu chéo có chiều dài (80-) 95-111(-455)nm với chiều rộng 16-20nm.



Hình 1. 1. Hình ảnh Myoviridae quan sát dưới kính hiển vi điện tử [128]

- Đặc tính hóa lý: Các hạt virion này có tỉ trọng nổi trong CsCl là 1,41 – 1,51 gcm⁻³.

- Axit nucleic: Khối lượng phân tử của genome hình thành 48% trọng lượng của hạt virion. Genome không bị cắt từng đoạn và chứa một đơn phân tử chuỗi kép ADN. Genome hoàn chỉnh chiếm 33.600 – 170.000 nucleotid chiều dài. Genome có guanin + cytosin chiếm 35 %. Chuỗi kép ADN được hoán vị tròn.

- Protein: Genome vi rút mã hóa các protein cấu trúc và các protein không cấu trúc.

b. Họ Siphoviridae [130]

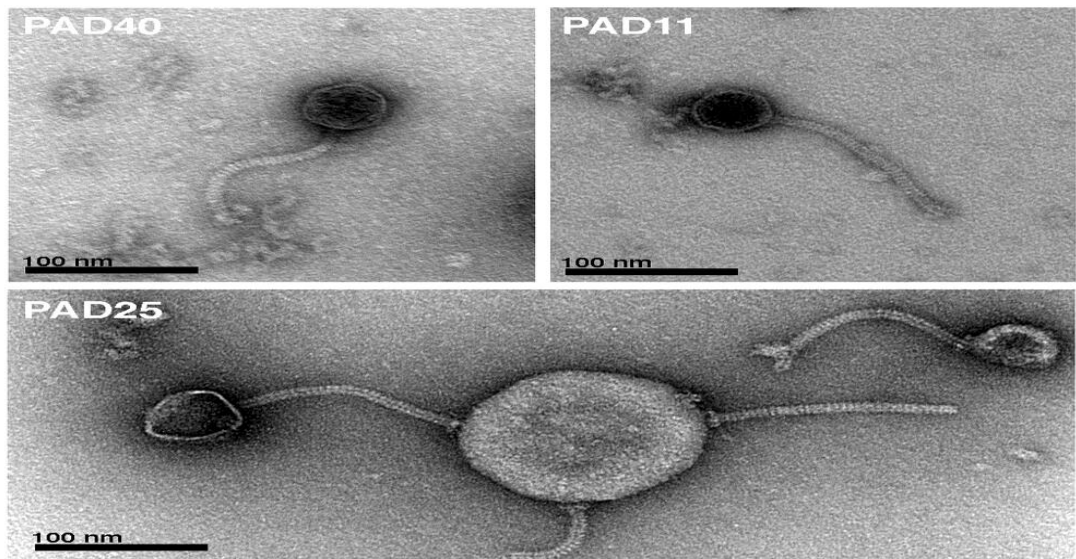
- Hình thái: Thực khuẩn thể tả bao gồm một đầu và một đuôi, không có vỏ. Thực khuẩn thể tả có đầu đối xứng 20 mặt và một đuôi với một đối xứng 6 ở đuôi và đối xứng 20 mặt ở đầu (T=7). Đầu có đường kính 60nm. Lớp vỏ capsid có hình lục lăng bao quanh, gồm 72 capsomer. Đuôi không co rút được là dạng filamentous, tập hợp thành đũa thập với một chiều dài (65-) 150 (-570)nm và một chiều rộng (7-) 8 (-10)nm. Đuôi có dạng sợi, ngắn, các sợi ở phần cuối hoặc nửa cuối.

- Đặc tính hóa lý: Các hạt virion có tỉ trọng nổi trong CsCl là 1,46 – 1,56 gcm⁻³.

- Axit nucleic: Khối lượng phân tử của genome hình thành 54% trọng lượng của virion. Genome không phân đoạn và chứa một đơn phân tử chuỗi kép ADN. Genome hoàn chỉnh có chiều dài 48.500 nucleotit. Genome chứa tổng lượng guanin + cytosin chiếm 52%. Chuỗi kép ADN không hoán vị, trình tự genome có điểm cuối cùng với đầu dính liền.

- Protein: Genome vi rút mã hóa các protein cấu trúc và không cấu trúc.

- Các vi rút Siphoviridae có một capsid với đường kính khoảng 55 – 60nm và một đuôi dài tới 570nm. Chuỗi kép ADN của nó dạng thẳng. Họ này bao gồm: phage λ, phage χ, phage φ80.



Hình 1. 2. Hình ảnh Siphoviridae quan sát dưới kính hiển vi điện tử [130]

c. Họ Podoviridae [129]

- Hình thái: Thực khuẩn thể tả bao gồm một đầu, một đuôi và không có vỏ. Thực khuẩn thể tả có một đầu đối xứng 20 mặt và một đuôi đối xứng 6 cạnh, được biểu hiện ở dạng đối xứng 20 mặt (T=7). Phần đầu có đường kính 60nm. Đầu có dạng lục lăng bên ngoài và bao gồm 72 capsomer. Phần đuôi thẳng ngắn và dày, không co rút được, đuôi có 6 sợi ngắn và các sợi ở nửa cuối.

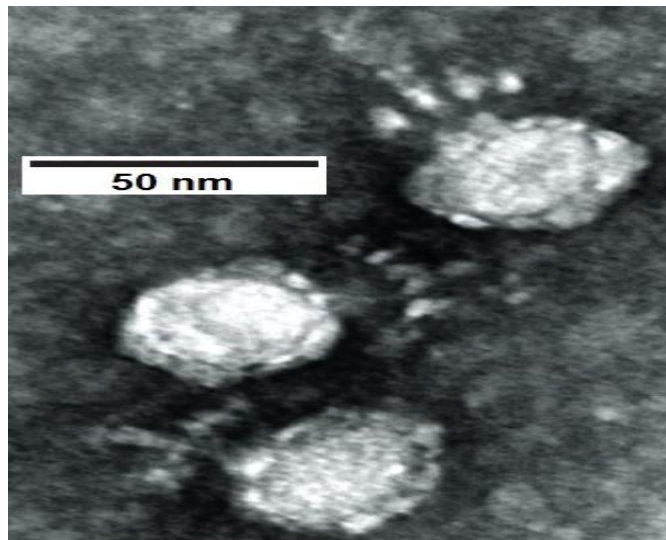
- Đặc tính hóa lý: Khối lượng phân tử virion khoảng 48×10^6 . Các hạt

virion có tỉ trọng nổi trong CsCl là $1,44 - 1,51 \text{ gcm}^{-3}$. Các hạt virion không nhạy cảm khi xử lý với ether và chloroform.

- Axit nucleic: Khối lượng phân tử của genome hình thành 50% trọng lượng của virion. Genome không bị phân đoạn và chứa một đơn phân tử của chuỗi kép ADN. Genome đã được giải trình tự hoàn toàn với chiều dài nucleotit là 42.000 nucleotid. Genome có guanine và cytosine chiếm 50%. Chuỗi kép ADN không hoán vị.

- Protein: Các protein hình thành khoảng 50% trọng lượng của hạt virion.

- Genome vi rút mã hóa các protein cấu trúc và không cấu trúc. Các hạt virion bao gồm ít nhất 9 protein cấu trúc nằm trong vỏ capsid.



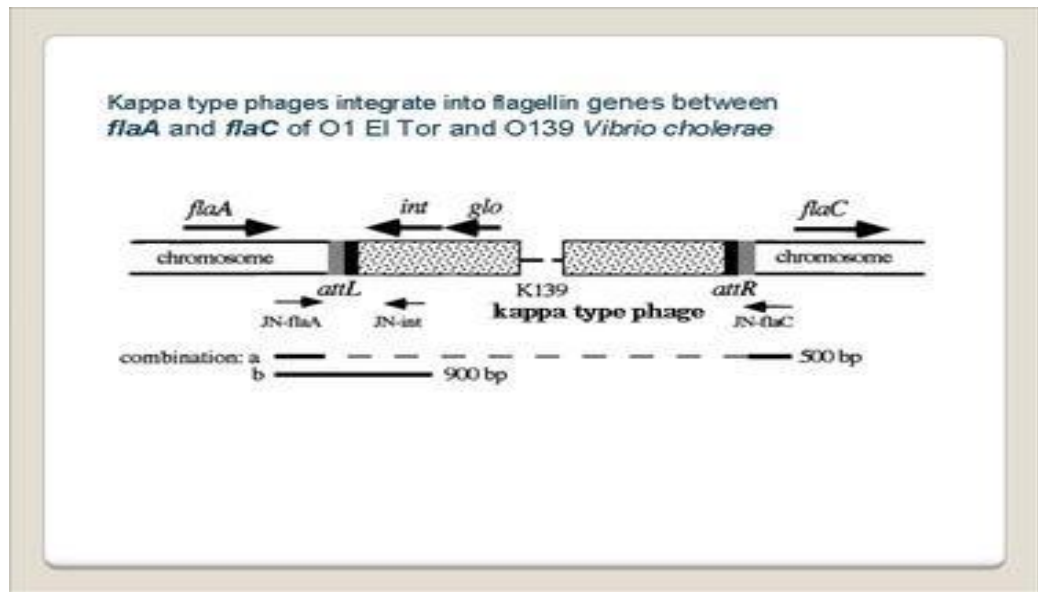
Hình 1. 3. Hình ảnh Podoviridae dưới kính hiển vi điện tử [129]

1.3.1.2. Thực khuẩn thể tả dạng sợi

Thực khuẩn thể tả dạng sợi bao gồm kappa phage, filamentous 1 (*fs1*) và filamentous 2 (*fs2*).

Kappa phage có thể kết nối với chủng vi khuẩn tả O1 El tor hoặc chủng tả O139 gây dịch. Phát hiện kappa phage gián tiếp qua việc phát hiện điểm nối của phage kappa nằm giữa gen *flaA* và *flaC* và vật chủ là vi khuẩn tả; các vật chủ vi khuẩn tả sẽ bị ly giải, với vi khuẩn tả O1 týp El tor và chủng tả O139

được quá trình này được thực hiện dễ dàng, chính xác hơn.

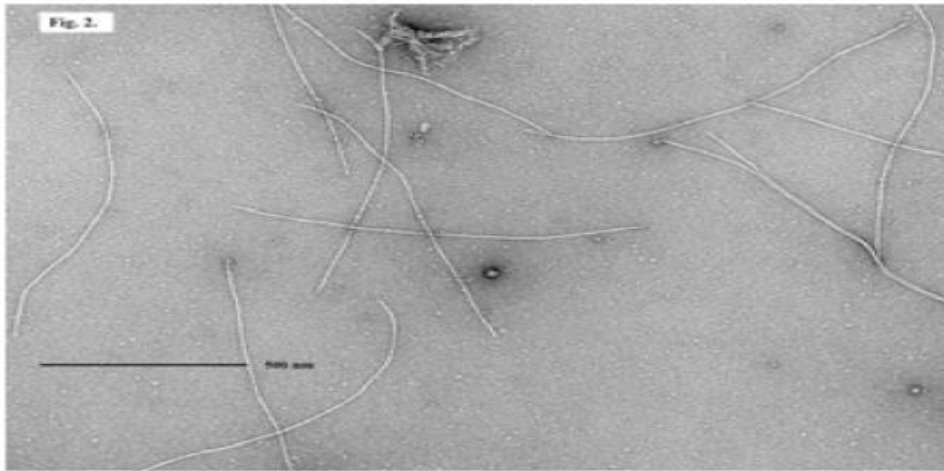


Hình 1. 4. Hình ảnh kappa phage gắn vào các gen nối giữa *flaA* và *flaC* của vi khuẩn tả O1 và O139 [47]

Kappa phage gắn vào nhiễm sắc thể nằm giữa các gen *flaA* và *flaC* và vật chủ là vi khuẩn tả, vật chủ vi khuẩn tả gắn với một kappa phage sẽ bị ly giải. Sơ đồ mô tả trên cho thấy chỉ có các chủng tả El tor và các chủng tả O139 có thể gắn với kappa phage còn chủng cổ điển không gắn.

Thực khuẩn thể tả mới là *fs1* và *fs2* mới được phân lập từ chủng vi khuẩn tả O139 MDO14 [56]. Thực khuẩn thể tả *fs2* là các hạt sợi dài 1.200nm và rộng 7nm. Hoạt động hình thành các vòng vết tan ổn định ở nhiệt độ 70°C nhưng bị ức chế khi xử lý với chloroform. Thực khuẩn thể tả *fs2* có hệ gen là chuỗi đơn ADN, được chuyển thành chuỗi kép và sao chép trong tế bào vật chủ. Hầu hết các chủng tả O139 và O1 tít sinh học El tor nhạy cảm với thực khuẩn thể tả này, nhưng phần lớn các chủng tả O1 cổ điển và non-O1 hay non-O139 kháng lại thực khuẩn thể tả *fs2*. Các nhà nghiên cứu cho rằng trình tự CTXΦ cần thiết cho thực khuẩn thể tả gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn tả ở vị trí đặc hiệu.

Về hình dạng, *fs1* không thể phân biệt với *fs2* do kích cỡ hoàn toàn giống nhau (7nm chiều rộng và 1,0 – 1,2 nm chiều dài); hầu hết *fs1* và *fs2* được tạo ra là polyphage. Hệ gen của *fs1* được mã hóa hình thành độc tố ruột mới tiềm năng đồng nhất với độc tố ZOT (zonula occludens toxin). Túp 4 fimbriae của vi khuẩn tả O1 nhạy với D – glucose và D – mannose được giả thiết là thụ thể của *fs1* và *fs2* [59].



Hình 1. 5. Hình ảnh đại diện của filamentous phage [160]

1.3.2. Sự lưu hành của thực khuẩn thể và thực khuẩn thể tả

1.3.3.1. Sự lưu hành của thực khuẩn thể

Thực khuẩn thể là những vi rút ký sinh trên vi khuẩn. Giống như tất cả các loại vi rút khác, chúng bắt buộc phải ký sinh trong nội bào của vi khuẩn, không có sự trao đổi chất nội bào và đòi hỏi bộ máy chuyển hóa của vật chủ hỗ trợ cho quá trình sinh sản của chúng. Thực khuẩn thể có mặt khắp nơi trên trái đất và được tìm thấy với số lượng lớn trong tự nhiên [46], [64], [85]. Có ước tính 10^{31} thực khuẩn thể, chúng phân bố gần như khắp nơi, trong bất cứ nơi nào có vi khuẩn; được tìm thấy trong hầu hết mọi môi trường cũng như trong ruột động vật và con người [44], [101], [114], [141]. Theo Jonczyk. E và cộng sự (2011) trong môi trường bất lợi, các thực khuẩn thể vẫn tồn tại [82].

Theo Miller và Day (2008), các thực khuẩn thể có 03 chu kỳ: tan (lytic cycle), tiềm tan (lysogen cycle) và giả tiềm tan (pseudolysogen cycle) [96]. Trong chu kỳ tan, thực khuẩn thể lây nhiễm vào tế bào, nhân lên và thoát khỏi tế bào để tiêu hủy tế bào vi khuẩn. Trong chu kỳ tiềm tan, thực khuẩn thể không sao chép nhưng bộ gen của nó biến thành trạng thái không hoạt động, gọi là prophage và tích hợp vào bộ gen của vật chủ hoặc được duy trì như một plasmid ngoại bào [85] (Guttman, Raya et al, 2003). Trong chu kỳ giả tiềm tan, thực khuẩn thể không trải qua quá trình tan, quá trình tiềm tan nhưng nó vẫn ở trạng thái không hoạt động [121] (Ripp and Miller, 1997). Chu kỳ giả tiềm tan xảy ra trong điều kiện khi nguồn cung cấp chất dinh dưỡng không đủ, khi đủ nguồn, thực khuẩn thể có thể quay lại chu kỳ tan hoặc tiềm tan.

Như vậy, có thể thấy thực khuẩn thể lưu hành rất phổ biến trong tự nhiên, theo sự có mặt của vật chủ.

1.3.3.2. Sự lưu hành của thực khuẩn thể tả

Năm 1896, Ernest Hankin đã báo cáo về sự hiện diện của một chất kháng khuẩn rõ rệt, chống lại vi khuẩn tả quan sát thấy ở vùng nước sông Hằng và sông Yamuna, Ấn Độ [72] Hai năm sau đó, vào năm 1898, Gamaleya đã quan sát thấy hiện tượng tương tự khi đang thử nghiệm với vi khuẩn *Bacillus subtilis* [124]. Năm 1915, Frederick Twort đã báo cáo một hiện tượng tương tự và đưa ra giải thuyết nó có thể là vi rút [147] . Tuy nhiên, người chính thức phát hiện và đặt tên cho thực khuẩn thể là Felix d'Herelle vào năm 1917 [52], [53], [54].

Madico, G. và cộng sự (1996) khi nghiên cứu về sự hiện diện của vi khuẩn tả O1 và thực khuẩn thể tả trong nguồn nước thải tại Peru từ năm 1993 đến năm 1996 trong chương trình giám sát dịch tả tại thủ đô Lima đã nhận thấy khả năng dịch tả bùng phát cao hơn 7,6 lần khi vi khuẩn tả O1 có mặt trong nước thải trong bốn tuần trước đó so với khi không có. Khả năng bùng phát

dịch bệnh cao gấp 2,4 lần khi có thực khuẩn thể tả trong nước thải trong 04 tuần trước so với khi không có. Như vậy, việc phát hiện vi khuẩn tả O1 và thực khuẩn thể tả trong nước thải 01 tháng trước khi bùng phát dịch có thể có tính dự báo sự bùng phát của dịch tả sau đó [93].

Ở nhiều quốc gia nơi có dịch tả hoành hành, thực khuẩn thể tả được phát hiện trong nước thải và được coi như là dấu hiệu chỉ điểm sự có mặt của thực khuẩn thể tả và giúp cho việc định tít chủng tả O1 và O139. Sự có mặt của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước bị nhiễm vi khuẩn tả O1 phụ thuộc vào khả năng thực khuẩn thể tả gây nhiễm và ly giải tế bào vi khuẩn tả [78]. Ở nhiều nước có dịch tả lưu hành theo mùa, giám sát môi trường đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát bệnh tả [61], [89].

Faruque, S.M và cộng sự (2005), Naser, I.B và cộng sự (2017) tìm thấy thực khuẩn thể tả trong mẫu nước tại Bangladesh [60], [105]; Seed, K.D và cộng sự (2011) xác định là thể thực khuẩn chiếm ưu thế trong các mẫu phân của bệnh nhân tả kể từ năm 2001 [131]. Angermeyer, A. và cộng sự (2018) tiến hành phân tích bộ gen của các thực khuẩn thể tả được bảo tồn từ năm 2001 đến năm 2012 để nghiên cứu về sự đồng tiến hóa của các thực khuẩn thể tả được bảo tồn với vi khuẩn tả góp phần trong việc xác định sự bùng phát của dịch tả [24].

Năm 2014, Al-Fendi, A. và cộng sự đã phân lập được 03 thể thực khuẩn tả tan họ Myoviridae từ các nguồn nước khác nhau (hồ, ao, sông, mương và nước thải) ở Kelantan, Malaysia; các thực khuẩn thể tả phân lập được ở nghiên cứu này có phạm vi vật chủ hẹp và chỉ có khả năng lây nhiễm đối với vi khuẩn tả O1 El tor Inaba [23].

Solis-Sanchez, A. và cộng sự (2016) khi lấy mẫu nước tại một con đập ở Mexico đã phân lập được 16 thực khuẩn thể nhưng chỉ có thực khuẩn thể ØVC8 là có khả năng ly giải chống lại vi khuẩn tả O1. Tại thời điểm phát hiện ra các

thực khuẩn thể tả này, địa điểm đó không có dịch tả lưu hành; tuy nhiên sự hiện diện của vi khuẩn tả non-O1/O139 gợi ý về khả năng của chủng vi khuẩn tả có thể tồn tại một khoảng thời gian dài trong nguồn nước thải bị ô nhiễm [136].

1.4. Tình hình nghiên cứu về khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả

1.4.1. Các phương pháp phát hiện và đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả

1.4.1.1. Các phương pháp phát hiện thực khuẩn thể tả (Phụ lục 1)

- Phương pháp phân lập từ mẫu nước (gồm mẫu nước bề mặt và mẫu môi gạc tôm).

- Phương pháp phân lập filamentous phage từ mẫu phân.

- Phương pháp xác định hình dạng thực khuẩn thể tả dưới kính hiển vi điện tử.

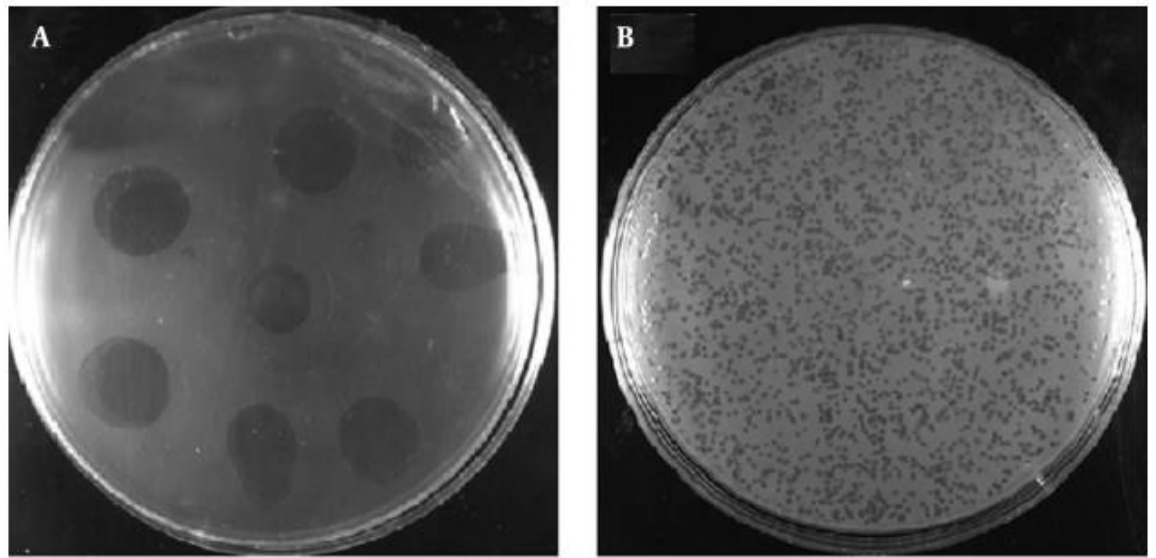
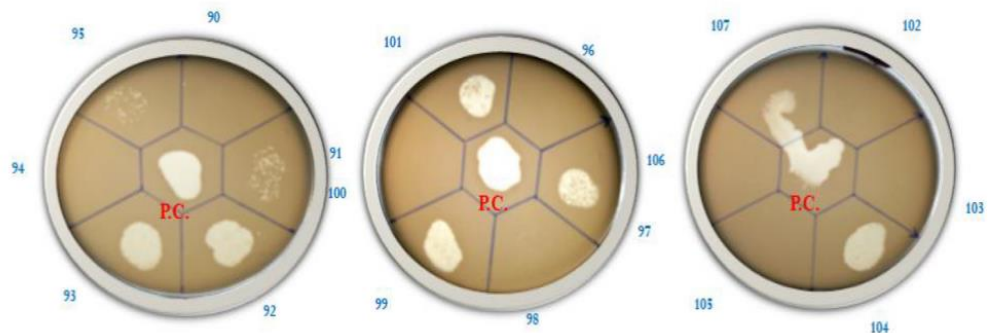
- Kỹ thuật PCR: cho phép xác định thực khuẩn thể tả trong mẫu nước nhờ khả năng sao chép khuếch đại số lượng đoạn trình tự ADN đặc hiệu trên genome của thực khuẩn thể tả.

- Kỹ thuật Southern blot: phân tích ADN của bộ gen thực khuẩn thể tả.

1.4.1.2. Cách xác định khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả

- Sự ly giải của thực khuẩn thể tả được xác định bằng số vết tan (plaque) trên vùng nhỏ mẫu của môi trường nuôi cấy:

Figure 1. Plaque Assay for MJ1 Phage

A, Spot test for the detection of MJ1 phage; and B, a higher dilution (10^{-6}) of phage titer showing clear plaques with an average diameter of 0.8 mm.**Hình 1. 6. Hình vệt tan (plaque) để phát hiện thực khuẩn thể MJ1 [77]**

P.C.: positive control (chứng dương)

Hình 1. 7. Hình ảnh vệt tan của thực khuẩn thể tả tại Hải Phòng và Thái Bình năm 2007-2008 [13]

- Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả được đánh giá qua sự ly giải của thực khuẩn thể tả ở các điều kiện nhiệt độ, pH, độ pha loãng khác nhau [14].

1.4.2. Liệu pháp phage

1.4.2.1. Liệu pháp phage là gì?

Liệu pháp phage hay liệu pháp điều trị bằng thực khuẩn thể có thể được mô tả như là việc sử dụng thực khuẩn thể để kiểm soát các tác nhân gây bệnh cụ thể hoặc vi khuẩn có vấn đề. Trong lĩnh vực y tế và sức khỏe con người, liệu pháp phage đã được thực hiện ở các vùng Đông Âu trong hơn 60 năm [87]. Các thử nghiệm phage giai đoạn sớm thường mang lại những kết quả chưa đáng tin cậy do việc chưa hiểu một cách đầy đủ về sinh học thực vật và kiểm soát chất lượng trong quá trình chuẩn bị các công thức trị liệu của phage.

Hiện tại, liệu pháp phage được sử dụng phổ biến ở một số nước Đông Âu như Nga, Ba Lan và Gruzia [45], [51]. Do mức độ đặc hiệu cao trong các loại vi khuẩn gây độc có thể coi đây là cách tự nhiên và hiệu quả để tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh cụ thể mà không ảnh hưởng đến vi khuẩn có lợi thông thường cũng như không ảnh hưởng tiêu cực tới môi trường. Với gia tăng các vi khuẩn kháng kháng sinh, dư lượng kháng sinh và hóa học trong thực phẩm và môi trường cũng như sự suy giảm trong nghiên cứu để phát triển các kháng sinh mới nên ngày nay các nhà khoa học ở các nước phương Tây lại có xu hướng quay trở lại nghiên cứu liệu pháp phage đối với người, động vật và môi trường như một liệu pháp sinh học tối ưu [45], [92].

Cazares và cộng sự (2020) đã trình bày ý kiến rằng sinh thái và tiến hóa của thực khuẩn thể thường bị bỏ qua trong liệu pháp phage, đặc biệt là tương tác giữa vi khuẩn và thực khuẩn thể và khuyến nghị nên kiểm tra cẩn thận những tương tác này để khai thác tốt hơn đặc tính kháng khuẩn của thực khuẩn thể [41]. Faunconnier và cộng sự (2019, 2021), Khalid và cộng sự (2021) đã nhận thấy tiềm năng trong ứng dụng liệu pháp phage ở các nước đang phát triển, đối với người có thu nhập thấp và trung bình. Họ đề xuất WHO phải có vai trò chính trong triển khai liệu pháp phage như giúp nâng cao kiến thức về liệu pháp phage và xây dựng cơ chế quản lý hệ thống sản phẩm thể thực khuẩn [62], [63] [84].

Pirnay (2020) dự đoán tình hình liệu pháp phage đến năm 2035 khả năng sẽ bị cá nhân hóa. Theo đó, khó sản xuất thực khuẩn thể tổng hợp từ sự nỗ lực của cộng đồng thông qua các tổ chức quốc tế liên quan đến trí tuệ nhân tạo và công nghệ số [116].

1.4.2.2. *Áp dụng liệu pháp phage*

a. Liệu pháp phage trên người

Liệu pháp phage được nghiên cứu tại Pháp từ năm 1919 bởi d'Herelle khi ông đã thành công trong điều trị một số đứa trẻ bị kiết lỵ tại một bệnh viện ở Pari bằng việc sử dụng phage phân lập từ phân của những người lính ở viện Pasteur [85], [86], [117]. Tuy nhiên, bài báo đầu tiên về liệu pháp phage lại đến từ Bi, Bruynoghe và Maisin vào năm 1921 với việc áp dụng liệu pháp phage để điều trị nhiễm khuẩn viêm da do tụ cầu trên 06 bệnh nhân (trong vòng 48 giờ, các triệu chứng sưng, đau, sốt đã được giảm đáng kể) [37]. Nghiên cứu về phage được d'Herelle đánh giá qua việc sử dụng liệu pháp phage tĩnh mạch điều trị cho bệnh nhân tả tại Ấn Độ vào năm 1921 [54]. Bên cạnh đó, ông đã hướng dẫn Tiến sĩ Davioud điều trị thành công một case nhiễm khuẩn tụ cầu nặng (sử dụng 5ml dung dịch staphylococcal phages pha loãng trong 500ml dung dịch nước muối sinh lý và truyền qua tĩnh mạch trong vòng 1 giờ).

Việc nghiên cứu và phát triển liệu pháp phage được tiếp tục tiến hành tại Pháp với việc thành lập phòng thí nghiệm về phage và sản xuất cocktail phage thương mại. Lang và cộng sự (1979) đã báo cáo việc sử dụng phage với 7 bệnh nhân bị nhiễm trùng mạn tính sau phẫu thuật chỉnh hình, trong đó các nhiễm trùng do tụ cầu được điều trị khỏi tuy nhiên nhiễm trùng với *Pseudomonas* vẫn còn [88].

Năm 1925, d'Herelle đã báo cáo về việc điều trị 04 bệnh nhân dịch hạch bằng phage liệu pháp. Sau đó, d'Herelle đã đến Ấn Độ để triển khai liệu pháp phage, đặc biệt áp dụng liệu pháp phage điều trị dịch tả cho khách hành hương

và trong các lễ hội tôn giáo ở Ấn Độ [53].

Bệnh tả do vi khuẩn tả gây ra là một thử nghiệm ý tưởng với liệu pháp phage do đặc điểm gây bệnh của nó. Tác nhân gây bệnh bị hạn chế trong ruột non, giải phóng độc tố tả, các phương thức lây truyền và đặc điểm dịch tễ học của bệnh được biết đến và hiệu quả của vắc-xin vẫn chưa có. Tuy nhiên, liệu pháp phage điều trị bệnh tả đã không được xác định rõ ràng trong điều trị bệnh nhân hoặc là một biện pháp dự phòng như d'Herelle đã hy vọng trước đó [52]. Người ta đã quan sát thấy mức độ nghiêm trọng, sự duy trì của các triệu chứng bệnh và tỷ lệ tử vong của bệnh nhân được giảm xuống ở nhóm dùng liệu pháp (qua đường miệng): tỷ lệ tử vong ở nhóm điều trị và không điều trị bằng liệu pháp phage là 8%/63%.

Mặc dù hầu hết các nghiên cứu điều trị bằng thực khuẩn thể cho thấy kết quả khả quan, nhưng nghiên cứu điều trị bằng thực khuẩn thể giảm vào những năm 1940 do sự phát triển mạnh mẽ của thuốc kháng sinh được coi là sử dụng đơn giản và hiệu quả [91]. Liệu pháp thể thực khuẩn cũng đã được sử dụng để chống lại bệnh tả từ những năm 1930 do Viện nghiên cứu thực khuẩn thể George Eliava thực hiện. Thử nghiệm điều trị đầu tiên giữa 02 nhóm bệnh nhân không điều trị và được điều trị bằng thực khuẩn thể tả. Kết quả là tỷ lệ tử vong trong nhóm không được điều trị bằng thực khuẩn thể là 20% cao hơn so với nhóm nhóm điều trị bằng thực khuẩn thể tả là 6,8 % [108]. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy kết quả tương tự. Mặc dù có những hạn chế như kiểm soát kém và kết quả điều trị không phù hợp, nhưng kết quả các nghiên cứu đã chứng minh có hiệu quả và có thể tiếp tục sử dụng các thể thực khuẩn để điều trị bệnh tả trên quy mô lớn tại một thời điểm sau đó. Từ năm 1928 đến năm 1934, hơn một triệu liều thực khuẩn thể tả đã được cung cấp cho cộng đồng ở Ấn Độ. Đây là lần đầu tiên thực khuẩn thể tả được sử dụng phổ biến như một phương tiện

dự phòng và tỷ lệ tử vong của dịch tả giảm từ 30 xuống còn 02 trên 10.000 dân được điều trị bằng thể thực khuẩn [108].

Vào cuối những năm 1960, WHO đã triển khai một thử nghiệm quốc tế về điều trị bệnh tả bằng liệu pháp phage ở Dhaka. Thử nghiệm này được thiết kế theo các tiêu chuẩn quốc tế được chấp nhận rộng rãi và được tiến hành với sự hỗ trợ, đánh giá của Viện Y tế Quốc gia Hoa Kỳ. Trong một số nghiên cứu do WHO tài trợ tại Đông Pakistan (nay là Bangladesh) vào những năm 1970, liệu pháp điều trị bằng thực khuẩn thể được so sánh với Tetracycline như là chất điều trị. Các báo cáo cho rằng liệu pháp phage liều rất cao có thể so sánh với Tetracycline trong việc làm giảm sự bài tiết vi khuẩn tả trong phân [94], [98].

Năm 2020, Jonas D. Van Bellghem và cộng sự đã nghiên cứu và phát hiện việc sử dụng liệu pháp phage có thể là một chiến lược điều trị thay thế hoặc phương pháp dự phòng đối với nhiễm trùng khớp giả sau thay khớp [149].

Năm 2021, Khalid và cộng sự đã xem xét ứng dụng thể thực khuẩn trong việc kiểm soát các bệnh do vi khuẩn truyền qua thực phẩm (thương hàn, tả, lỵ trực khuẩn, *E. coli* gây tiêu chảy) và bệnh lao; kết quả cho thấy liệu pháp phage có thể là một giải pháp kiểm soát dịch bệnh ở các nước đang phát triển [84].

Trong nghiên cứu của Renee N. Ng và cộng sự (2021) về ứng dụng liệu pháp phage trong điều trị nhiễm trùng *P. aeruginosa* ở bệnh nhân bị xơ nang phổi đã nhận thấy những triển vọng đáng kể trong việc trì hoãn sự khởi phát nhiễm trùng đa kháng thuốc khi sử dụng kháng sinh để điều trị dự phòng nhiễm trùng phổi do vi khuẩn [109].

b. Liệu pháp phage trên mô hình động vật

Bhandare, S. và cộng sự (2019) đã sử dụng một thực khuẩn thể đơn họ Podoviridae (ký hiệu là Phi_1) để kiểm soát bệnh tả bằng phương pháp dự phòng và điều trị trên mô hình thỏ con. Trong cả 02 trường hợp, động vật được

điều trị bằng thể thực khuẩn không có dấu hiệu lâm sàng của bệnh so với 69% động vật đối chứng không được điều trị. Số lượng vi khuẩn trong ruột của động vật được xử lý bằng thực khuẩn thể đã giảm tới $4\log_{10}$ đơn vị hình thành khuẩn lạc/g [31]. Theo tác giả, đây là nghiên cứu đầu tiên đưa ra bằng chứng một thực khuẩn thể đơn lẻ có thể có hiệu quả trong điều trị bệnh tả mà không phát hiện được mức độ kháng cự của vi khuẩn tả. Nghiên cứu khuyến cáo các thử nghiệm lâm sàng trên người nên được xem xét.

William Smith và các đồng nghiệp của ông đã báo cáo việc sử dụng thành công liệu pháp phage để điều trị nhiễm *E. coli* thực nghiệm ở chuột [133]. Trong các nghiên cứu tiếp theo, các tác giả nhận thấy rằng một liều duy nhất liệu pháp phage của *E. coli* đã làm giảm số lượng các vi khuẩn trong đường tiêu hóa của bê, cừu và heo con bị nhiễm *E. coli* gây tiêu chảy. Tất cả các động vật được điều trị bằng liệu pháp phage đều sống sót sau nhiễm khuẩn [134], [135]. Tính hữu dụng của liệu pháp phage trong phòng và điều trị bệnh thực nghiệm ở chuột và lợn mắc *P. aeruginosa* và *Acinetobacter* [29], [138] cũng đã được công bố.

Cũng như các phương pháp thực nghiệm trên động vật nhằm mục đích thử nghiệm sơ bộ liệu pháp phage trước khi áp dụng trên người [138] đã báo cáo lợi ích của phage liệu pháp trong phòng và điều trị thử nghiệm trên chuột và lợn bị nhiễm khuẩn *P. aeruginosa* và *Acinetobacter*, và đề xuất liệu pháp phage có thể có hiệu quả trong việc ngăn ngừa nhiễm trùng da được sử dụng để điều trị bệnh nhân bỏng.

Một số nghiên cứu gần đây như đánh giá hiệu quả của liệu pháp phage để điều trị nhiễm trùng do *K. ozaenae*, *K. pneumoniae* và *K. rhinoscleromatisscleromatis* gây ra. Phage liệu pháp đã được báo cáo: (1) hiệu quả trong kinh nghiệm điều trị nhiễm khuẩn trên chuột và (2) không độc với chuột và lợn; nói một cách khác toàn bộ quá trình thay đổi bên trong và bên ngoài của động vật thí nghiệm đã không được quan sát sau khi tiêm tĩnh mạch. Ngoài

ra, các tác giả đã mô tả nồng độ phage tối ưu, lộ trình quản lý và báo cáo những chi tiết thích hợp khác mà họ coi là quan trọng trong việc thiết kế những tình nguyện viên thử nghiệm tiếp theo. Sau đó họ sử dụng các kết quả nghiên cứu tiền lâm sàng để đánh giá tính an toàn và hiệu quả của các phage trong điều trị cho 109 bệnh nhân nhiễm *Klebsiella*. Liệu pháp phage được báo cáo có hiệu quả trong điều trị nhiễm *Klebsiella* và không độc đối với bệnh nhân [32], [33].

Các nghiên cứu về liệu pháp phage trong nuôi trồng thủy, hải sản gần đây cũng được triển khai ngày càng nhiều do việc kháng kháng sinh, gây hại cho môi trường khi sử dụng hóa chất khử khuẩn ... đã ảnh hưởng tiêu cực, gây thiệt hại rất lớn cho nền kinh tế. Các nghiên cứu đề xuất về thời điểm (mùa), nhiệt độ, liều thích hợp của liệu pháp phage trên thủy, hải sản cũng như việc tuyển chọn phage phù hợp đối với mỗi loài, phối hợp các phage với nhau cũng như đánh giá tác động của liệu pháp phage trên hệ sinh thái nói chung của thủy, hải sản [113], [140].

Trong bài viết của Ewa Jonczyk-Matysiak và cộng sự (2020), T. Scott Brady và cộng sự (2021) nhận thấy bên cạnh sinh bệnh học, dịch tễ học, chẩn đoán, điều trị và vấn đề kháng kháng sinh đối với ấu trùng *P. larvae* lây nhiễm bệnh cho ong mật, người ta đặc biệt chú ý đến đặc điểm kiểu hình và kiểu gen của thể thực khuẩn ấu trùng *P. larvae* để áp dụng liệu pháp phage trong kiểm soát dịch bệnh [34], [81].

Kaixiang Jia và cộng sự (2020) đã tuyển chọn được một thể thực khuẩn mới (IME-JL8) họ Siphoviridae của vi khuẩn *C. freundii* và đã mô tả hiệu quả ly giải in vitro và ảnh hưởng lên màng sinh học đối với vi khuẩn. Các thí nghiệm tại nghiên cứu đã chứng minh ứng dụng đầy hứa hẹn của phage này để phòng ngừa và điều trị vi khuẩn *C. freundii* gây nhiễm trùng cá [80].

Đối với tụ cầu vàng (*S. aureus*), các nghiên cứu của Lei Wangs và cộng sự (2020), Yoona Lee và cộng sự (2021) đã phân lập được các thể thực khuẩn

có tác dụng kiểm soát sinh học tụ cầu vàng trong các môi trường chế biến thực phẩm và lâm sàng khác nhau (Lei Wang), hoặc thử nghiệm in vitro kết hợp thực khuẩn thể với kháng sinh đã giúp loại bỏ màng sinh học của *Staphylococcus* kháng với kháng sinh Rifampin (Yoona Lee) [90], [150]. Son và cộng sự (2021) đã thiết kế một loại Endolysin (Lys 109) có hiệu quả chống lại *S. aureus* [137].

Do tính đặc hiệu của thực khuẩn thể, để thực khuẩn thể có thể lây nhiễm và có tác dụng lên tất cả các chủng của một loài vi khuẩn, các nhà khoa học đã nghiên cứu, chuẩn bị các hỗn hợp phage chứa nhiều phage khác nhau lây nhiễm vào một loài với các nồng độ ly giải khác nhau; Haines và cộng sự (2021) đã sàng lọc 68 thể thực khuẩn để tuyển chọn ra 06 thể thực khuẩn tác dụng với 38 chủng vi khuẩn liên quan đến nhiễm trùng đường tiết niệu có kháng kháng sinh [71]. Kết quả là hỗn hợp phage gồm 06 thực khuẩn thể có thể tiêu diệt hiệu quả 23/38 chủng (61%) trong đó đối với *Klebsiella* là 13/19 chủng (68%) và đối với *E. coli* là 10/19 chủng (53%). Nale và cộng sự (2021) đã sử dụng 22 thực khuẩn thể để thiết kế hỗn hợp phage chứa 03 thực khuẩn thể được chọn để chống lại nhiều loại vi khuẩn *Salmonella* ở lợn, gia cầm và trong phòng thí nghiệm; hiệu lực của hỗn hợp phage đã được xác nhận cả trong phòng thí nghiệm, trên thực tế về điều trị và phòng ngừa nhiễm khuẩn *Salmonella* [103].

c. Liệu pháp phage trên mô hình ngoại cảnh

Liệu pháp phage trên mô hình nước ngoại cảnh được báo cáo khá sớm qua mô tả mối liên hệ giữa vi khuẩn tả và thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoại cảnh. D'Herelle và Malone's cho rằng sự chấm dứt của dịch tả là do sự lây lan của vi khuẩn từ các trường hợp nghỉ dưỡng. Pasricha và cộng sự (1931) [115] đã nghiên cứu tỷ lệ thực khuẩn thể tả trong môi trường ngoại cảnh và mối quan liên quan của chúng với vi khuẩn tả ở Calcutta và nhận thấy thực khuẩn thể tả trong môi trường ngoại cảnh có sự biến đổi: tỷ lệ mắc và tử vong cao vào đầu mùa dịch tả, giảm nhanh chóng khi thực khuẩn thể tả được phân

bổ rộng rãi trong môi trường ngoại cảnh. Các nhà nghiên cứu đã cho rằng thực khuẩn thể đóng vai trò quan trọng trong việc giảm tỷ lệ tử vong và kết thúc vụ dịch.

Khoảng 60 năm sau khi Pasricha và cộng sự báo cáo về mối quan hệ thú vị giữa tả và thực khuẩn thể tả, Shah và cộng sự (2005) đưa ra một kết quả tương tự, nhưng với phương pháp lấy mẫu có hệ thống, bổ sung đầy đủ kiến thức về vi khuẩn tả và thể thực khuẩn tả [60]. Trong khoảng thời gian ba năm, các nhà khoa học đã phân tích một cách hệ thống các mẫu nước thu thập từ hai con sông lớn và một hồ nước ở Dhaka. Kết quả cho thấy phần lớn các mẫu nước có mối quan hệ nghịch đảo giữa sự hiện diện của thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải một nhóm huyết thanh nhất định của vi khuẩn tả và sự hiện diện của một chủng của cùng một nhóm huyết thanh. Mặt khác, số lượng bệnh nhân tả thay đổi theo mùa trong thời gian nghiên cứu và thường xuyên xảy ra đồng thời với sự hiện diện của các chủng vi khuẩn tả gây bệnh trong mẫu nước mà không phát hiện được thực khuẩn thể tả [60].

1.4.3. Ứng dụng trong dự phòng, kiểm soát bệnh/dịch tả

Nghiên cứu về liệu pháp phage với vi khuẩn tả cũng được các nhà nghiên cứu quan tâm. Liệu pháp phage là một trong những phương pháp hữu ích để xác định và phân biệt các dòng vi khuẩn tả mặc dù trước đây nghiên cứu về phage chủ yếu được hướng tới việc điều trị hoặc dự phòng hơn là phân biệt chủng tả. Chương trình đánh giá phage đã được quốc tế công nhận của Basu và Mukerjee (1968) bao gồm 5 phages (I, II, III, IV, và V), theo đó chủng vi khuẩn tả O1 có thể phân biệt thành 6 loại phage khác nhau. Phage týp đã được thực hiện thường xuyên trên cơ sở của chương trình này tại Viện nghiên cứu Quốc gia về tả và các bệnh đường ruột (NICED) Kolkata từ năm 1968 [75].

Vào cuối năm 1992, xuất hiện của một nhóm huyết thanh học mới của vi khuẩn tả, được gọi là vi khuẩn tả O139 Bengal. Sự xuất hiện của O139 Bengal

đã dẫn tới việc mở rộng nghiên cứu tìm hiểu và phân lập các phage đáp ứng với chủng tả mới này. Tổng cộng 500 chủng vi khuẩn tả O139 đã được đánh giá với danh sách các tít phage tương ứng. Các chủng được chia thành 10 loại phage khác nhau, trong đó loại 1 (38,2%) là loại chủ đạo, tiếp theo là loại 2 (22,4%) và loại 3 (8%). Tại Ấn Độ, việc theo dõi thường xuyên loại phage của các chủng vi khuẩn tả O1 phân lập là rất quan trọng. Bất kỳ sự thay đổi đáng chú ý nào trong loại phage có thể làm tăng nghi ngờ sự nổi lên của một chủng tả mới. Các phages có thể đóng một vai trò quan trọng như là một dự báo tiềm năng của sự bùng phát của bệnh, đây là một tín hiệu hữu ích sớm để theo dõi các biện pháp kiểm soát bệnh tả. NICED vẫn đang tham gia nghiên cứu về các loại phage của vi khuẩn tả. Các nhóm khác đang làm việc để phân loại các phage của các loại vi khuẩn khác ở Nga và Canada. Tất cả các phân lập của vi khuẩn tả từ các vùng khác nhau của quốc gia đều được gửi đến NICED, Kolkata để xác nhận, tìm huyết thanh, đặc điểm sinh học và loại phage. Tổng cộng có 10 phage O1 và 5 phage O139 đã được đưa vào hai chương trình riêng biệt được duy trì tại NICED. Các thực khuẩn thể này được cung cấp cho các viện khác nhau cho các mục đích nghiên cứu theo từng thời điểm [75].

Theo Chakrabarti AK và cộng sự (2000), ở các vùng dịch tả lưu hành, các thực khuẩn thể tả được phát hiện với tần xuất cao ở những môi trường sống dưới nước khác nhau và các thực khuẩn thể tả này được sử dụng làm chất đánh dấu chủng để xác định kiểu phage của vi khuẩn tả O1 và vi khuẩn tả O139 [43].

Các nghiên cứu của Faruque S.M và cộng sự (2005) đã chỉ ra việc biến động trong quần thể thực khuẩn thể theo thời gian trong năm của bệnh tả và việc giám sát vi khuẩn tả trong môi trường nước là những yếu tố quan trọng có liên quan đến dịch tả [75].

Các nghiên cứu trong nước đối với lĩnh vực y học về thực khuẩn thể và thực khuẩn thể tả còn rất ít. Nguyễn Đồng Tú và cộng sự (2008) triển khai

ngiên cứu giám sát vi khuẩn tả O1 và thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoài cảnh và các yếu tố dự báo dịch và nghiên cứu thực khuẩn thể tả thu thập được tại mẫu nước ngoài cảnh tại Thái Bình. Kết quả nghiên cứu đã giải trình tự gen của thực khuẩn thể kappa (thực khuẩn thể của các chủng tả El tor), ND1fs1 (thực khuẩn thể phân lập được từ chủng tả O139 lần đầu tiên phân lập được tại Việt Nam), thực khuẩn thể *fs1*, *fs2* và đề xuất các biện pháp nghiên cứu về thực khuẩn thể tả cũng như các yếu tố dự báo dịch tả [8], [9].

1.5. Đặc điểm chung địa bàn nghiên cứu

Miền Bắc Việt Nam bao gồm đồng bằng sông Hồng, Trung du và miền núi phía Bắc. Đồi núi chiếm đa số diện tích của miền Bắc và dân cư tập trung chủ yếu tại đồng bằng sông Hồng. Do mật độ dân cư đông, cũng như đặc điểm địa hình sông ngòi, ven biển nên vùng đồng bằng sông Hồng (trong đó có Hà Nội, Hải Phòng, Nam Định và Thái Bình) cũng là nơi có tỷ lệ bệnh truyền nhiễm nói chung cao hơn các vùng khác, trong đó có bệnh tả.

Bệnh tả lần đầu tiên xuất hiện tại Việt Nam vào năm 1850. Trong đó, Hải Phòng là địa phương đầu tiên tại miền Bắc lây dịch tả từ Hồng Kông năm 1937-1938 qua đường biển, tiếp đó là những vụ dịch rải rác từ sau 1975 trở lại đây. Trong giai đoạn 2000-2007, Hải Phòng là nơi xuất hiện dịch nhiều nhất, tiếp đó là Hà Nội, tiếp theo là Thái Bình và Nam Định [2], vụ dịch năm 2007 tại Hà Nội kéo dài đến sang 2008 [111]. Năm 2010, tỷ lệ mắc tả/100.000 dân tại Hà Nội là 3,53, Hải Phòng là 0,8 và Nam Định là 1,4 [4].

Bệnh tả hiện nay vẫn là mối nguy cơ không chỉ cho nước ta mà còn cả cộng đồng thế giới. Nghiên cứu sử dụng thực khuẩn thể tả là việc làm không mới trên thế giới nhưng nó phù hợp với Việt Nam hơn trong giai đoạn này khi mà ngày càng xuất hiện các vi khuẩn siêu kháng thuốc và chưa có báo cáo nào nói về tác dụng phụ không mong muốn của việc sử dụng liệu pháp thể thực khuẩn. Bên cạnh đó, khi kinh tế xã hội phát triển, giao thông thuận lợi, việc di

chuyển giữa các vùng khá dễ dàng dẫn tới việc phòng bệnh và ngăn chặn dịch tả gặp nhiều khó khăn. Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào báo cáo về khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong xử lý các nguồn nước ngoại cảnh nói chung hoặc khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong xử lý các nguồn nước nhiễm vi khuẩn tả trong cộng đồng nói riêng. Do vậy, nghiên cứu này sẽ tiến hành đánh giá sự lưu hành của thực khuẩn thể tả đồng thời tiến hành đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong các điều kiện môi trường khác nhau của phòng thí nghiệm cũng như đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả đối với các nguồn nước ngoại cảnh thu thập từ các địa điểm nghiên cứu tại miền Bắc Việt Nam. Nhóm nghiên cứu mong muốn tìm ra các thực khuẩn thể có thể thay thế các vật liệu, hóa chất trong xử lý nước sinh hoạt tại các vùng dịch và cũng có thể giúp giảm mật độ vi khuẩn tả gây bệnh trong môi trường ngoại cảnh tại các vùng dịch góp phần trong việc ngăn chặn sự lan rộng của dịch là vấn đề cần tập trung giải quyết mà nghiên cứu này hướng tới.

CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm, thời gian nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1.1. Mục tiêu 1:

- Mẫu nước ngoại cảnh (mẫu nước bề mặt và mẫu môi gạc tôm) ở kênh/mương, đầm/ao/hồ, sông được thu thập tại bốn tỉnh/thành phố ở miền Bắc Việt Nam.

2.1.1.2. Mục tiêu 2:

- Các chủng thực khuẩn thể tả phân lập được từ các mẫu trong mục tiêu 1 và một số chủng trong kho chủng của phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

- Các chủng vi khuẩn tả phân lập được từ các vụ dịch tả tại Việt Nam, Ấn Độ, Nhật Bản, Bangladesh, Thái Lan thuộc kho chủng của phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

- Các vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác trong kho chủng của phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

- Mẫu nước ngoại cảnh và sinh hoạt ở các nguồn nước: nước máy; nước sông/suối; nước giếng; nước mưa và nước ao/hồ được thu thập tại bốn tỉnh ở miền Bắc Việt Nam.

* Tiêu chuẩn loại trừ:

Các mẫu chủng lưu trong kho của phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (gồm chủng thực khuẩn thể tả, vi khuẩn tả, vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác) không còn hoạt động.

2.1.2. Địa điểm nghiên cứu

2.1.2.1. Mục tiêu 1

- Nhóm nghiên cứu chọn Thành phố Hà Nội, Hải Phòng; các tỉnh Thái Bình, Nam Định đưa vào nghiên cứu này vì các lý do sau:

* Thành phố Hà Nội được chọn do là nơi khởi phát dịch đầu tiên của một số vụ dịch gần đây ở miền Bắc năm 2004, năm 2007- 2008 [2], [17], [18].

* Các tỉnh/thành phố Thái Bình, Hải Phòng, Nam Định được chọn do:

+ Là các tỉnh/ thành phố có vùng cửa sông ven biển, nơi thích hợp cho sự tồn tại và phát triển của các chủng tả và thực khuẩn thể tả [2], [7], [23], [60].

+ Là các tỉnh/thành phố có khởi phát dịch tả tại miền Bắc trong những vụ dịch gần đây [2], [6]: Thái Bình (2000), Hải Phòng (2002).

+ Tỉnh Nam Định là nơi khởi phát dịch tả năm 2009 tại miền Bắc, đồng thời là nơi chủng tả O139 lần đầu tiên được phân lập tại Việt Nam [160].

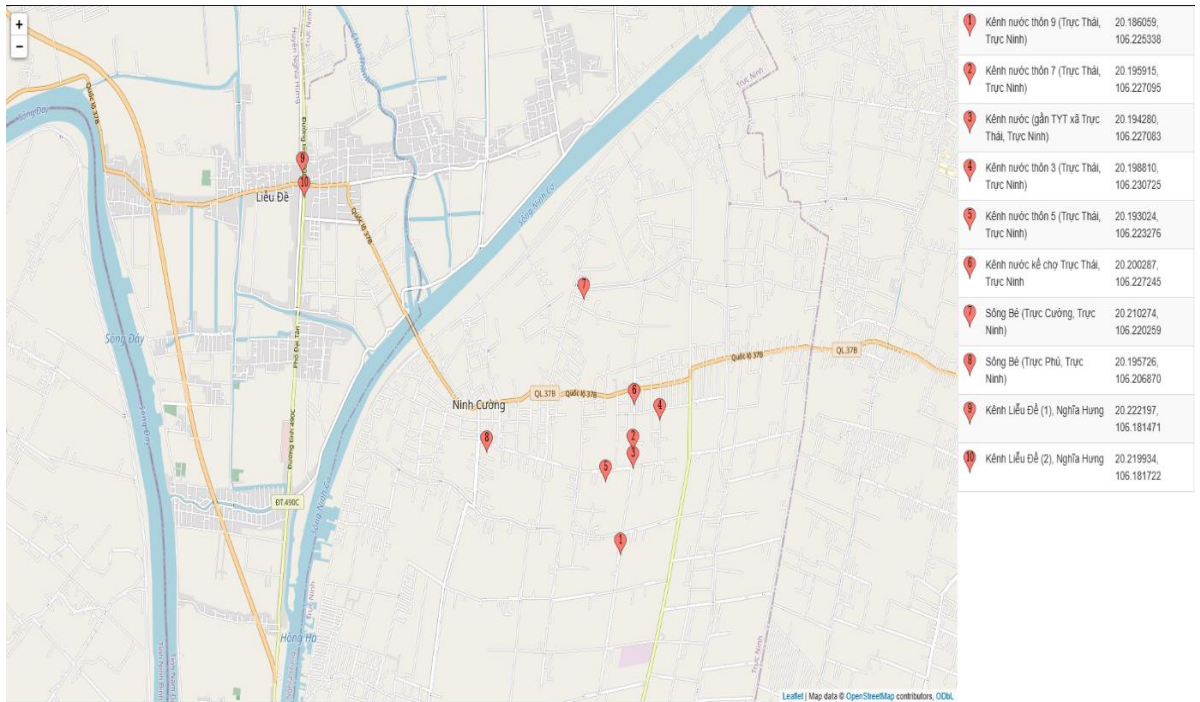
- Tại các tỉnh/thành phố Nam Định, Thái Bình, Hải Phòng và Hà Nội; nhóm nghiên cứu chọn 40 vị trí (mỗi tỉnh/thành phố chọn 10 điểm). Việc chọn 10 vị trí lấy mẫu trên 01 tỉnh/thành phố dựa trên cơ sở sau:

+ Tại mỗi tỉnh/thành phố chia làm 3 loại điểm lấy mẫu nước gồm: nơi có dòng chảy tự nhiên (sông); nơi có nguồn nước dùng tưới tiêu/nước thải sinh hoạt (kênh/mương); nơi có nguồn nước không lưu chuyển thường xuyên (hồ/ao/đầm). Lựa chọn 10 điểm lấy mẫu/1 tỉnh, thành phố trên cơ sở tham khảo nghiên cứu trước đây của Ngô Tuấn Cường và cộng sự năm 2008 [8].

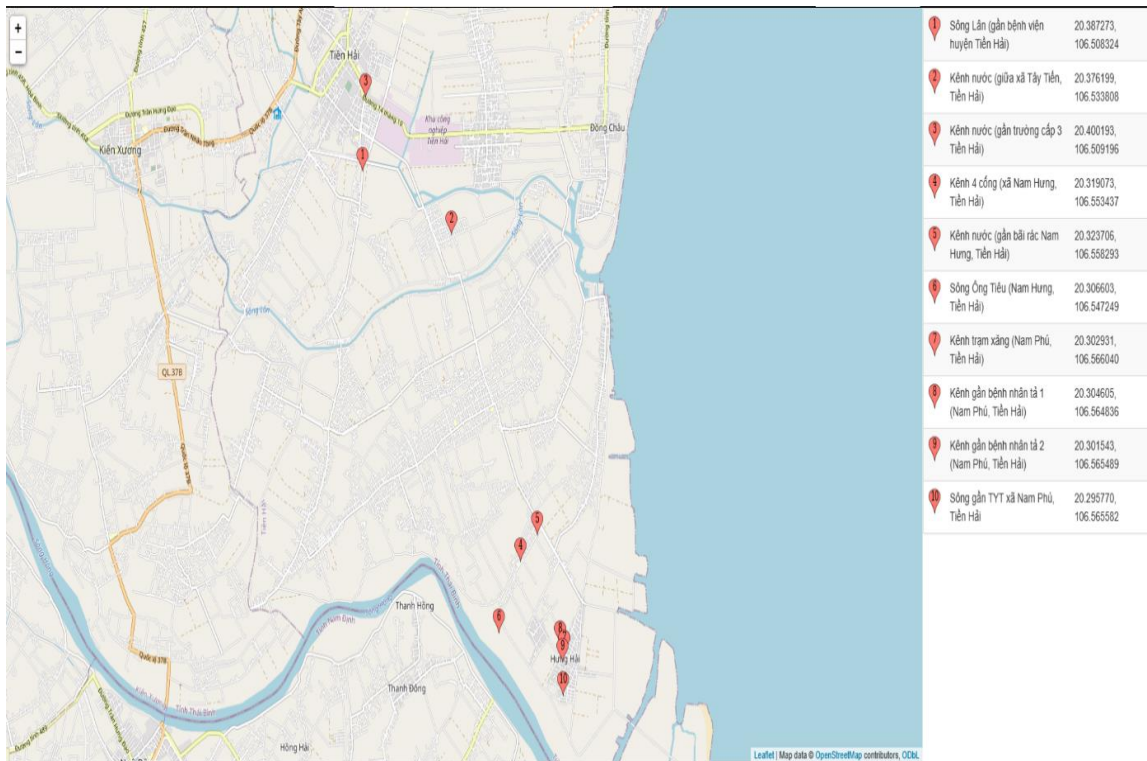
+ Nhóm nghiên cứu tiến hành chọn vị trí lấy mẫu và loại mẫu dựa trên cơ sở tham khảo thông tin trong Cẩm nang phòng chống bệnh tả của Bộ Y tế, trong nghiên cứu trước đây của Ali Al-Fendi và cộng sự tại Malaysia năm 2014 [2], [7], [23], [60].

+ Các vị trí lấy mẫu tại các tỉnh/thành phố phù hợp các tiêu chí như: gần nhà bệnh nhân tả khởi phát đầu tiên của các vụ dịch tả được báo cáo trong những năm trước đây; các vị trí thuộc vùng cửa sông ven biển là nơi thích hợp cho sự tồn tại và phát triển của các chủng tả và thực khuẩn thể [2], [6], [7].

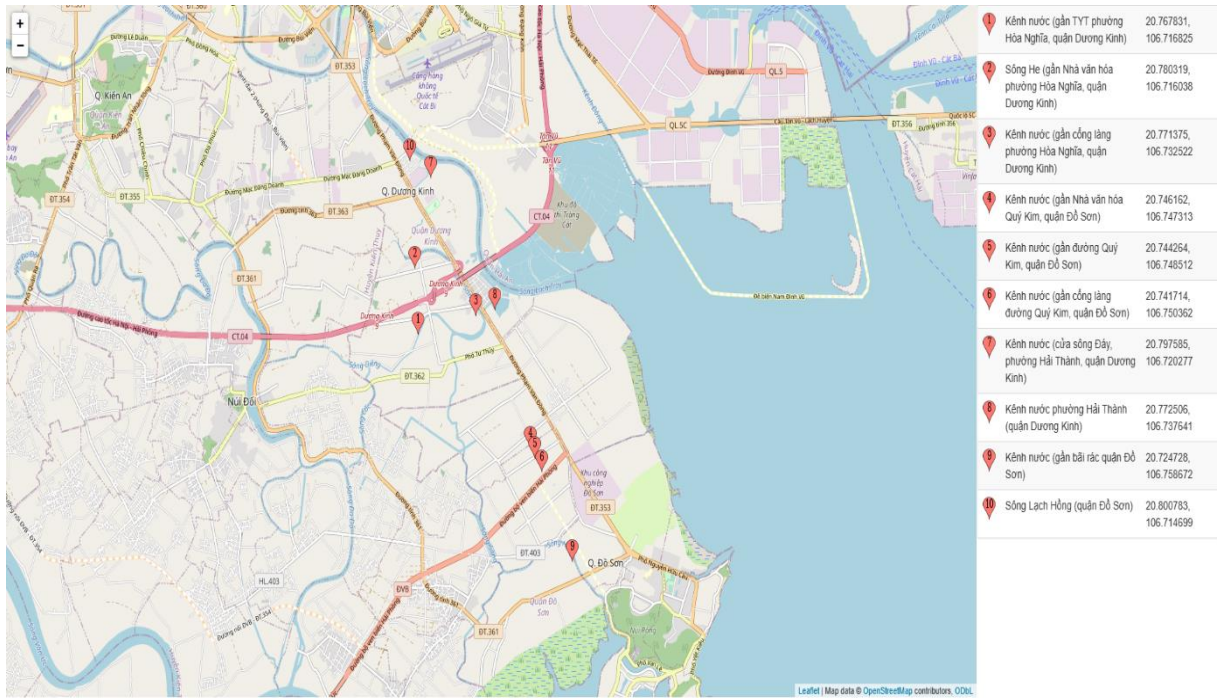
Trên cơ sở các tiêu chí trên, nhóm nghiên cứu chọn 10 vị trí lấy mẫu tại mỗi tỉnh/thành phố, cụ thể như sau (*xem tại Phụ lục 2*).



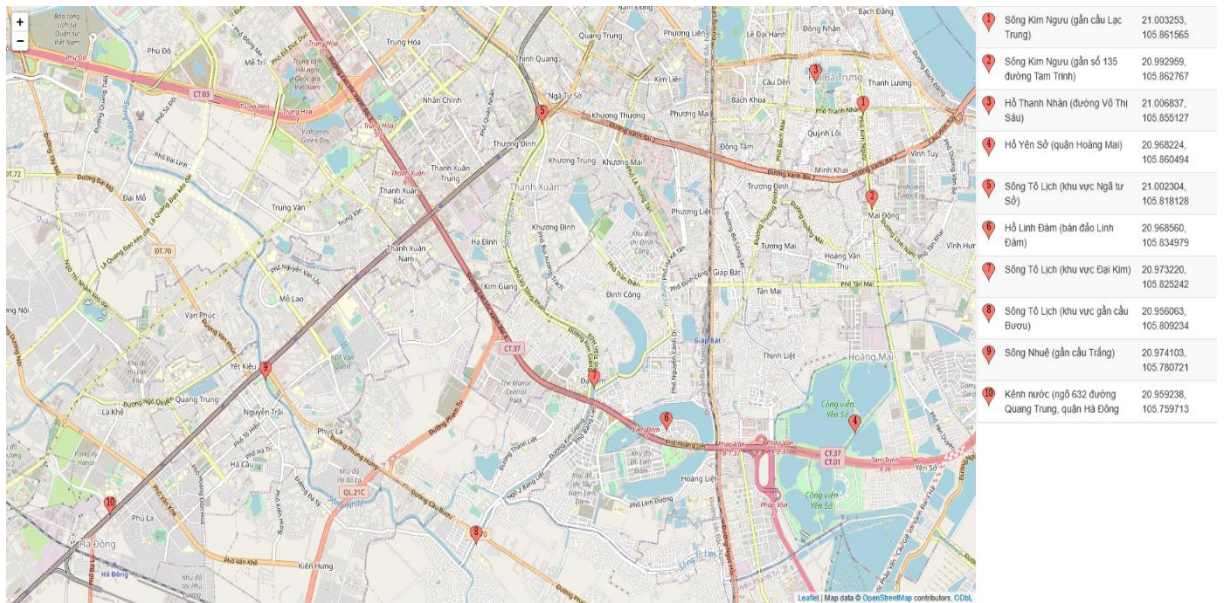
Sơ đồ 2. 1. Vị trí lấy mẫu tại Nam Định



Sơ đồ 2. 2. Vị trí lấy mẫu tại Thái Bình



Sơ đồ 2. 3. Vị trí lấy mẫu tại Hải Phòng



Sơ đồ 2. 4. Vị trí lấy mẫu tại Hà Nội

2.1.2.2. Mục tiêu 2

- Tại phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

- Do điều kiện hạn chế về kinh phí, nhóm nghiên cứu tiến hành thu thập mẫu nước ngoại cảnh và sinh hoạt đại diện cho 05 nguồn nước tại cộng đồng (nước máy; nước sông/suối; nước giếng; nước mưa/bể chứa; nước ao/hồ) tại các tỉnh Nam Định, Thái Bình, Hải Phòng và Hà Nội và đưa về 1 địa điểm tại xã Trục Thái, huyện Trục Ninh, tỉnh Nam Định đặt trong 20 chum nước (loại 50 lít/chum) để tiến hành thả thực khuẩn thể tả vào các chum nước này trong thời gian 06 tháng (từ tháng 02/2020 đến tháng 08/2020). Tiến hành lấy mẫu định kỳ hàng tháng trong vòng 06 tháng.

2.1.3. Thời gian nghiên cứu

2.1.3.1. Mục tiêu 1

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 12/2017 đến tháng 02/2020.
- Thời gian bao phủ số liệu: tháng 2/2018 đến tháng 8/2019.

2.1.3.2. Mục tiêu 2

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 02/2020 đến tháng 12/2020.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

2.2.1.1. Mục tiêu 1

- Phương pháp nghiên cứu: Mô tả cắt ngang

2.2.1.2. Mục tiêu 2

- Phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu thực nghiệm so sánh trước sau không có nhóm chứng.

2.2.2. Cỡ mẫu

2.2.2.1. Mục tiêu 1: Xác định sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoại cảnh tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam

Áp dụng công thức sau cho việc thu thập mẫu nước ngoại cảnh:

$$N = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times p \times (1-p)}{d^2} \times DEEF$$

Trong đó:

- Z: hệ số tin cậy
- $\alpha = 0,05$
- $Z^2(1-\alpha/2) = 1,96$
- $p = 0,36$ tỷ lệ phân lập thực khuẩn thể tả từ mẫu nước ngoài cảnh trong nghiên cứu trước đây của phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương [13].
- d: độ chính xác tuyệt đối, $d= 0,05$
- DEEF: hệ số thiết kế. Do dự kiến lấy 2 loại mẫu nước bề mặt và môi gạc tôm để tăng khả năng phân lập và xác định sự có mặt của thực khuẩn thể và lấy mẫu ở nhiều địa điểm khác nhau nên chọn hệ số thiết kế DEEF = 2.

Áp dụng công thức tính ra cỡ mẫu với dự phòng 13% là $n=800$.

2.2.2.2. Mục tiêu 2: Đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong phòng thí nghiệm và trên thực địa cộng đồng ở các môi trường nước khác nhau

a. Xác định khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả đối với chủng vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác

- Gồm 36 chủng thực khuẩn thể tả: 10 chủng phân lập được trong nghiên cứu tại mục tiêu 1 và 26 chủng thực khuẩn thể lưu trữ tại kho chủng của phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (danh mục xem tại Phụ lục 3).

- Gồm 13 chủng vi khuẩn tả và 07 chủng vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác tại kho chủng của phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (danh mục xem tại Phụ lục 4).

b. Xác định khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả trong một số điều kiện pH, nhiệt độ, mật độ pha loãng khác nhau tại phòng thí nghiệm

Địa điểm/ loại mẫu	Năm 2018						Năm 2019				Tổng cộng
	Tháng 2	Tháng 4	Tháng 6	Tháng 8	Tháng 10	Tháng 12	Tháng 2	Tháng 4	Tháng 6	Tháng 8	
Kênh/Mương	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	80
Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sông	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
Thái Bình	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100
Kênh/Mương	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	80
Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sông	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
Nam Định	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100
Kênh/Mương	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	90
Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sông	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
Tổng cộng	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	400
Kênh/Mương	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	260
Đầm/Ao/Hồ	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	30
Sông	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	110

2.2.3.2. Mục tiêu 2

- Thực khuẩn thể tả: chọn toàn bộ 26 chủng thực khuẩn thể tả có trong kho chủng và 10 chủng thực khuẩn thể tả phân lập được từ mục tiêu 1, tổng số là 36 chủng (*danh mục xem tại Phụ lục 3*).

- Chủng vi khuẩn tả: chọn đại diện theo phân loại tít sinh học (có 04 chủng ở Việt Nam; 09 ở nước ngoài) gồm 03 loại: vi khuẩn tả O1 cổ điển, vi khuẩn tả O1 El tor và vi khuẩn tả O1 Bengal (*danh mục xem tại Phụ lục 4*). 04 chủng vi khuẩn tả ở Việt Nam trên tổng số 886 chủng vi khuẩn tả được lấy đại diện theo năm, theo vụ dịch và theo thời gian. 09 chủng vi khuẩn tả ở nước ngoài trên tổng số 81 chủng vi khuẩn tả trong kho chủng lưu trữ được lấy ngẫu nhiên mỗi tít sinh học 03 đại diện. Trong đó:

+ Chủng tả O1 cổ điển: phân lập được từ các vụ dịch tả tại Ấn Độ, Thái Lan, Bangladesh.

+ Chủng tả O1 El tor: phân lập được từ các vụ dịch tả tại Ấn Độ, Nhật Bản, Bangladesh.

+ Chủng tả O139 Bengal: phân lập được từ các vụ dịch tả tại Ấn Độ, Bangladesh.

+ Chủng tả phân lập được tại một số vụ dịch tả tại Việt Nam năm 1995, 2003, 2007, 2010.

- Thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể với các chủng vi khuẩn tả thu thập từ các vụ dịch tả trong thời gian trước đây và một số chủng tả gây dịch tại Việt Nam nhằm xác định nhạy cảm của thực khuẩn thể với các vi khuẩn tả. Các chủng vi khuẩn tả tham gia vào thử nghiệm bao gồm 03 chủng vi khuẩn tả O1 cổ điển, 03 chủng vi khuẩn tả O1 El tor, 03 chủng vi khuẩn tả O139 Bengal và 04 chủng vi khuẩn tả O1 phân lập được từ các vụ dịch tả tại Việt Nam.

- Thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể với các chủng vi khuẩn tả và các chủng vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác nhằm xác định độ đặc hiệu của thực khuẩn thể với các vi khuẩn tả.

- Lấy ngẫu nhiên 7 mẫu vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác trong tổng số 1200 chủng lưu trữ, đảm bảo mỗi loại chủng có 1 đại diện, bao gồm: (1) *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; (2) *V. parahaemolyticus* F1 – BN tiêu chảy; (3) *V. parahaemolyticus* ShTb2 – Đầm nuôi tôm; (4) *E. coli* ATCC 25922; (5) *S. flexneri* 2b ATCC 12022; (6) *S. enteritidis* ATCC 13076; (7) *S. aureus* ATCC 11632.

- Thực khuẩn thể tả sử dụng trong hoạt động thử nghiệm về khả năng tồn tại và khả năng ly giải với vi khuẩn tả ở các điều kiện nguồn nước khác nhau là thực khuẩn thể tả có mã số VP04, là thực khuẩn thể tả phân lập được trong nghiên cứu trong mẫu nước tại Hải Phòng vào tháng 8 năm 2018 (Mục tiêu 1) và cũng là chủng thực khuẩn thể tả ly giải với nhiều chủng vi khuẩn tả nhất,

đặc biệt là với các chủng phân lập được từ các vụ dịch tả tại Việt Nam.

2.3. Biến số nghiên cứu

Các biến số nghiên cứu được thu thập:

STT	Biến số	Mô tả	Chỉ số
<i>Mục tiêu 1: Xác định sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoài cảnh tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2018 –2019</i>			
1	Loại mẫu nước	Loại mẫu nước gồm có mẫu nước bề mặt/mẫu nước gạc tôm. Loại nước mẫu gồm có kênh/mương, đầm/ao/hồ, sông	Tỷ lệ phần trăm từng loại mẫu nước
2	Số lượng mẫu thu thập	Số lượng mẫu thu thập theo tháng, năm; theo địa điểm lấy mẫu; theo loại nước mẫu bề mặt hay môi gạc tôm	Tỷ lệ phần trăm phân bố mẫu nước theo thể loại mẫu, địa điểm lấy mẫu và thời gian
3	Kết quả xét nghiệm nuôi cấy phân lập	Kết quả xét nghiệm nuôi cấy phân lập phát hiện chủng chỉ thị Mak757 O1, Eltor H218 O1, Classic AI4450 O139, Bengal theo loại mẫu nước, theo địa điểm lấy mẫu, theo thời gian tháng/năm.	- Phân bố thực thể khuẩn tả theo phân loại mẫu nước - Phân bố thực thể khuẩn tả theo địa điểm lấy mẫu - Phân bố thực thể khuẩn tả theo thời gian
4	Kết quả xét	Theo loại mẫu nước, địa điểm lấy mẫu, thời gian tháng/năm	- Phân bố gen

STT	Biên số	Mô tả	Chỉ số
	nghiệm PCR thực khuẩn thể tả (fs1, fs2)		theo phân loại mẫu nước - Phân bố gen theo địa điểm lấy mẫu - Phân bố gen theo thời gian
<i>Mục tiêu 2: Đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong các điều kiện môi trường khác nhau.</i>			
1	Nhạy cảm của thực khuẩn thể tả với các chủng vi khuẩn tả	Khả năng ly giải của thực khuẩn thể với các chủng vi khuẩn tả	Tỷ lệ phần trăm thực khuẩn thể ly giải các chủng vi khuẩn thể tả
2	Nhạy cảm của thực khuẩn thể tả với các loại vi khuẩn đường ruột	Khả năng ly giải của thực khuẩn thể với các loại vi khuẩn đường ruột khác nhau	Tỷ lệ phần trăm thực khuẩn thể ly giải các loại vi khuẩn đường ruột khác nhau
3	Nhạy cảm của thực khuẩn thể trong các độ pha loãng	Khả năng ly giải của các thực khuẩn thể với các điều kiện pha loãng mật độ thực khuẩn thể khác nhau	Tỷ lệ phần trăm thực khuẩn thể ly giải ở các độ pha loãng khác nhau
4	Nhạy cảm của thực	Khả năng ly giải của các thực khuẩn thể trong các môi trường	Tỷ lệ phần trăm thực khuẩn thể ly

STT	Biến số	Mô tả	Chỉ số
	khuẩn thể trong các môi trường pH khác nhau	pH khác nhau	giải trong các môi trường pH khác nhau
5	Nhạy cảm của thực khuẩn thể trong các điều kiện nhiệt độ môi trường khác nhau	Khả năng ly giải của các thực khuẩn thể trong các điều kiện nhiệt độ môi trường khác nhau	Tỷ lệ phần trăm thực khuẩn thể ly giải trong các điều kiện nhiệt độ môi trường khác nhau
6	Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04	Tại các nguồn nước sinh hoạt và ngoại cảnh (nước máy, nước sông/suối, nước giếng, nước mưa, nước ao/hồ) theo tuần/tháng	Phân bố mật độ thực khuẩn thể theo thời gian
7	Nhạy cảm của thực khuẩn thể VP04 đối với H218 O1 Classic với nguồn nước sinh hoạt	Khả năng ly giải của thực khuẩn thể VP04 đối với H218 O1 Classic đối với nguồn nước sinh hoạt	Tỷ lệ phần trăm thực khuẩn thể VP04 ly giải H218 O1 Classic với nguồn nước sinh hoạt
8	Nhạy cảm của thực khuẩn thể VP04 đối	Khả năng ly giải của thực khuẩn thể VP04 đối với H218 O1 Classic đối với nguồn nước	Tỷ lệ phần trăm thực khuẩn thể VP04 ly giải

STT	Biến số	Mô tả	Chỉ số
	với H218 O1 Classic với nguồn nước ngoại cảnh	ngoại cảnh	H218 O1 Classic với nguồn nước ngoại cảnh

2.4. Phương pháp thu thập thông tin

2.4.1. Mục tiêu 1

- Cách thức thu thập mẫu: Thu thập 500ml/mẫu vào khoảng thời gian từ 6h-9h sáng tuần đầu tiên của các tháng (vào các tháng 02, 04, 06, 08, 10, 12); các mẫu được bảo quản trong chai thủy tinh có nắp xoáy, giữ ở điều kiện mát, tránh ánh sáng và vận chuyển ngay về phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương để tiến hành xét nghiệm mẫu. Mẫu nước và mẫu môi gạc tôm được thu thập cùng vị trí và cùng địa điểm; mẫu môi gạc tôm được đặt, ngâm mẫu từ chiều hôm trước và thu mẫu vào sáng hôm sau cùng thời điểm với thu thập mẫu nước.

- Nghiên cứu sử dụng phương pháp nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể; sử dụng kỹ thuật nuôi cấy trong thử nghiệm tuyển chọn thực khuẩn thể tả (*xem tại Phụ lục 5*).

- Phản ứng PCR cho phép phát hiện thực khuẩn tả dạng sợi *fs1*, *fs2* trong mẫu nước bề mặt và môi gạc tôm (*xem tại Phụ lục 5*).

2.4.1. Mục tiêu 2

2.4.1.1. *Đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả với các điều kiện và đối tượng thử nghiệm khác nhau tại phòng thí nghiệm*

Tiến hành đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong một số điều kiện thử nghiệm (với một số vi khuẩn tả gây dịch trên thế giới và Việt

Nam; với một số chủng vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác; pha loãng mật độ thực khuẩn thể tả; pH, nhiệt độ thay đổi), cụ thể:

- Đưa mật độ mật độ thực khuẩn thể tả về điều kiện chuẩn để tiến hành thử nghiệm (khoảng 10^9 thực khuẩn thể/ml nước).

- Tiến hành thử nghiệm với các điều kiện thử nghiệm của nghiên cứu.

- Đánh giá kết quả thông qua đọc kết quả ly giải/không ly giải sau thời gian quy định (*xem tại Phụ lục 5*).

2.4.1.2. Đánh giá khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong mẫu nước sinh hoạt và mẫu nước tự nhiên trong môi trường ngoại cảnh

- Tiến hành thả thực khuẩn thể tả vào các nguồn nước trên (đã nêu tại mục 2.1.2.2.) với mật độ khoảng 10^9 thực khuẩn thể/ml [67], [119]. Lấy mẫu định kỳ hàng tháng trong vòng 06 tháng tại các thời điểm: ngay tại thời điểm ban đầu (T0), sau 01 tuần, 02 tuần, 01 tháng, 03 tháng, 06 tháng [132].

- Lấy 500ml mẫu nước tại các chum nước này theo nguyên tắc lấy mẫu nước quy định giai đoạn trước - sau khi thả thực khuẩn thể tả, các mẫu được bảo quản trong chai thủy tinh có nắp xoáy, giữ ở điều kiện mát, tránh ánh sáng và vận chuyển ngay về phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương để tiến hành xét nghiệm mẫu (*xem tại Phụ lục 5*).

- Tiến hành đánh giá sự tồn tại và khả năng ly giải theo thời gian thông qua đọc kết quả ly giải/không ly giải sau thời gian quy định (*xem tại Phụ lục 5*).

- Đánh giá khả năng ly giải: tìm các vệt tan/Plaque tại các vị trí nhỏ dung dịch thực khuẩn thể và đánh giá theo các mức độ sau:

Kết quả được đánh giá là 0: không có vệt tan/Plaque tại các vị trí nhỏ mẫu thử nghiệm.

Kết quả được đánh giá là 1+: số các vệt tan/Plaque tại vị trí nhỏ mẫu

thử nghiệm < 10 vết tan/Plaque.

Kết quả được đánh giá là 2+: số các vết tan/Plaque tại vị trí nhỏ mẫu thử nghiệm > 10 vết tan/Plaque. Các vết tan còn rõ các ranh giới.

Kết quả được đánh giá là 3+: số các vết tan/Plaque tại vị trí nhỏ mẫu thử nghiệm > 10 vết tan/Plaque. Các vết tan không rõ các ranh giới.

2.5. Sai số và các biện pháp khắc phục

- Các thí nghiệm được lặp lại nhiều lần nếu thấy nghi ngờ. Bên cạnh đó, khi thực hiện các thí nghiệm luôn có hai người để một người thao tác và người còn lại quan sát và ghi chép.

- Sai lệch kết quả do kỹ lấy mẫu và xét nghiệm: cán bộ thực hiện được tập huấn, làm theo quy trình kỹ thuật chuẩn trước khi thực hiện nghiên cứu cũng như tập huấn nhắc lại trước các đợt lấy mẫu (*xem tại Phụ lục 5*).

- Ảnh hưởng của hóa chất sinh phẩm xét nghiệm: đã dùng các hóa chất sinh phẩm xét nghiệm hiện đang được lưu hành và áp dụng rộng rãi trong các phòng xét nghiệm. Ngoài ra sử dụng các chứng chuẩn để kiểm tra chất lượng các hóa chất sinh phẩm chẩn đoán trước khi đưa vào sử dụng

- Sai số khi nhập liệu: 2 cán bộ nhập liệu và tiến hành đối chiếu kết quả để có bản số liệu hoàn chỉnh cuối cùng.

2.6. Xử lý, phân tích số liệu

- Số liệu sẽ được nhập vào máy tính sử dụng phần mềm Epi Data software 3.1 và phân tích bằng phần mềm SPSS 12.0. Phần mềm Bio-numeric software sẽ được sử dụng để phân tích các đặc tính sinh học phân tử của các chủng thực khuẩn thể tả.

- Nhập số liệu và kiểm tra số liệu đã nhập.

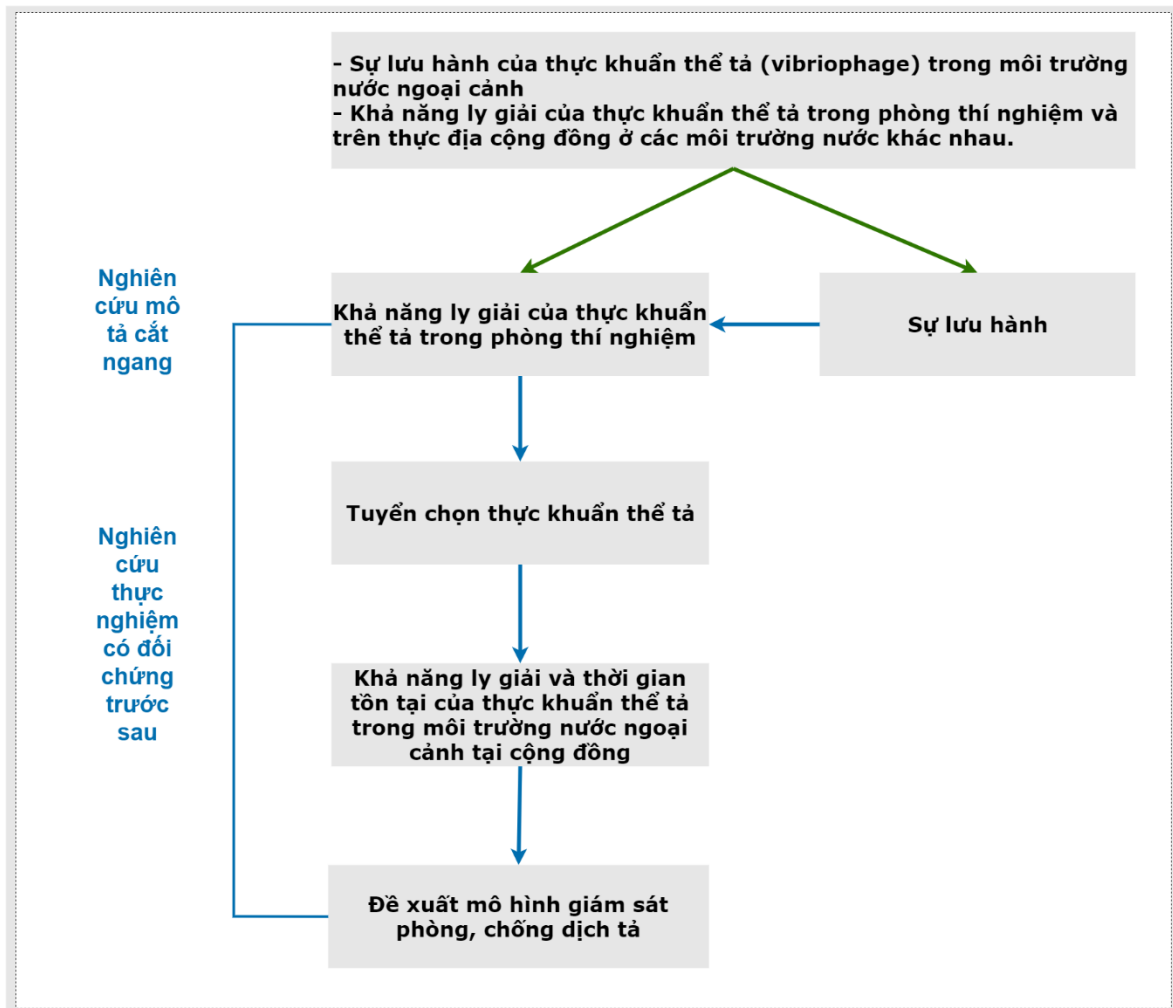
- Phân tích số liệu bằng phần mềm Stata version 12.0, bản quyền của đại học Nagasaki.

- So sánh khả năng phát hiện thực khuẩn thể tả theo phương pháp xét nghiệm (phân lập/PCR) theo loại mẫu thu thập (mẫu môi gạo tằm/mẫu nước bề mặt) được ước lượng bằng OR và 95%CI.

2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng mẫu nước từ môi trường và được phép sử dụng chủng thực khuẩn thể tả, vi khuẩn tả, vi khuẩn gây bệnh đường ruột sẵn có được lưu trữ bảo quản tại phòng Vi khuẩn đường ruột, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và không liên quan đến con người. Nghiên cứu được thực hiện theo Quyết định đánh giá đề cương chi tiết số 1624/QĐ-VSDTTU ngày 08 tháng 11 năm 2017 và Quyết định về việc điều chỉnh tên đề tài số 1478/QĐ-VSDTTU ngày 15 tháng 10 năm 2018 của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương về việc cho phép triển khai nghiên cứu này tại các địa bàn nghiên cứu gồm 04 tỉnh/thành phố Hà Nội, Hải Phòng, Thái Bình, Nam Định. Các chủng vi khuẩn và thực khuẩn thể phân lập được chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu, được thao tác đảm bảo an toàn sinh học cho người thao tác và môi trường.

2.8. Sơ đồ nghiên cứu



Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoài cảnh tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2018 – 2019

3.1.1. Một số đặc điểm chung của các mẫu nước ngoài cảnh được thu thập

Bảng 3. 1. Số lượng mẫu nước theo cặp mẫu (mẫu nước bề mặt và mẫu môi gạc tôm) thu thập được trong giai đoạn 2018-2019

Địa điểm/ loại mẫu	Năm 2018						Năm 2019				Tổng	
	Tháng 2	Tháng 4	Tháng 6	Tháng 8	Tháng 10	Tháng 12	Tháng 2	Tháng 4	Tháng 6	Tháng 8	Số lượng	%
Kênh/Mương	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	260	65,0
Đầm/Ao/Hồ	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	30	7,5
Sông	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	110	27,5
Tổng	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	400	100

Bảng 3.1. cho thấy, tổng số mẫu thu thập được trong giai đoạn nghiên cứu từ tháng 2/2018 đến tháng 08/2019 tại 40 điểm nghiên cứu thuộc 04 tỉnh/thành phố là 800 mẫu (400 cặp mẫu), trong đó có 400 mẫu nước bề mặt và 400 mẫu môi gạc tôm.

Bảng 3. 2. Tỷ lệ phân bố mẫu nước bề mặt, mẫu môi gạc tôm theo thể loại mẫu, 2018 - 2019

Điểm lấy mẫu	Số lượng		Tổng	
	Nước bề mặt	Môi gạc tôm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Kênh/mương	260	260	520	65,0
Đầm/Ao/Hồ	30	30	60	7,5
Sông	110	110	220	27,5
Tổng	400	400	800	100,0

Tại Bảng 3.2 cho thấy, trong tổng số 800 mẫu nước bề mặt và mẫu môi gạc tôm, số lượng mẫu lấy tại kênh/mương chiếm số lượng lớn (số lượng=520; 65%), tiếp theo là sông (số lượng=220; 27,5%) và hồ nước (số lượng=60; 7,5%).

3.1.2. Kết quả xét nghiệm mẫu nước bề mặt, mẫu môi gạc tôm bằng phương pháp nuôi cấy phân lập

Bảng 3. 3. Kết quả nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả theo mẫu nước bề mặt, 2018-2019

Địa điểm/	Nước bề mặt					
	Số mẫu	Chủng chỉ thị			Tổng	
		Mak757O1, Eltor	H218 O1, Classic	AI4450 O139, Bengal	Số lượng	%/ số mẫu
Hà Nội						
Kênh/Mương	10				0	0,0
Đầm/Ao/Hồ	30				0	0,0
Sông	60				0	0,0
Tổng	100	0	0	0	0	0,0
Hải Phòng						
Kênh/Mương	80	1	3		4	5,0
Đầm/Ao/Hồ	0				0	
Sông	20		1		1	5,0
Tổng	100	1	4	0	5	5,0
Nam Định						
Kênh/Mương	90				0	0,0
Đầm/Ao/Hồ	0				0	
Sông	10				0	0,0
Tổng	100	0	0	0	0	0,0
Thái Bình						
Kênh/Mương	80		3		3	3,8

Địa điểm/	Nước bề mặt					
	Số mẫu	Chủng chỉ thị			Tổng	
		Mak757O1, Eltor	H218 O1, Classic	AI4450 O139, Bengal	Số lượng	%/ số mẫu
Đầm/Ao/Hồ	0				0	
Sông	20				0	0,0
Tổng	100	0	3	0	3	3,0
Tổng cộng						
Kênh/Mương	260	1	6	0	7	2,7
Đầm/Ao/Hồ	30	0	0	0	0	0,0
Sông	110	0	1	0	1	0,9
Tổng	400	1	7	0	8	2,0

Kết quả nêu tại Bảng 3.3 cho thấy, không có thực khuẩn thể tả nào phân lập được bằng việc sử dụng chủng chỉ thị AI4450 (O139), có 01 chủng phân lập được bằng việc sử dụng chủng chỉ thị Mak757 (O1, El tor) và có 07 chủng thực khuẩn thể tả phân lập được bằng việc sử dụng chủng chỉ thị H218 (O1, cổ điển). Các mẫu nước bề mặt lấy tại Hà Nội và Nam Định không phân lập được thực khuẩn thể tả; các mẫu nước bề mặt lấy tại Hải Phòng và Thái Bình phân lập được lần lượt là 05 chủng và 03 chủng thực khuẩn thể tả. Không có thực khuẩn thể tả nào phân lập được từ các mẫu nước lấy tại ao/hồ, có 07 thực khuẩn thể tả phân lập được từ các mẫu nước lấy tại kênh/mương và 01 thực khuẩn thể tả phân lập được từ mẫu nước sông.

Bảng 3. 4. Kết quả nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả theo mẫu môi gạc tôm, 2018-2019

Địa điểm/	Môi gạc tôm					
	Số mẫu	Chủng chỉ thị			Tổng	
		Mak757O1, Eltor	H218 O1, Classic	AI4450 O139, Bengal	Số lượng	%/ Số mẫu
Hà Nội						
Kênh/Mương	10				0	0,0

Địa điểm/	Môi gạc tôm					
	Số mẫu	Chủng chỉ thị			Tổng	
		Mak757O1, Etor	H218 O1, Classic	AI4450 O139, Bengal	Số lượng	%/ Số mẫu
Đầm/Ao/Hồ	30				0	0,0
Sông	60				0	0,0
Tổng	100	0	0	0	0	0,0
Hải Phòng						
Kênh/Mương	80				0	0,0
Đầm/Ao/Hồ	0				0	
Sông	20				0	0,0
Tổng	100	0	0	0	0	0,0
Nam Định						
Kênh/Mương	90				0	0,0
Đầm/Ao/Hồ	0				0	
Sông	10				0	0,0
Tổng	100	0	0	0	0	0,0
Thái Bình						
Kênh/Mương	80		2		2	2,5
Đầm/Ao/Hồ	0				0	
Sông	20				0	0,0
Tổng	100	0	2	0	2	2,0
Tổng cộng						
Kênh/Mương	260	0	2	0	2	0,8
Đầm/Ao/Hồ	30	0	0	0	0	0,0
Sông	110	0	0	0	0	0,0
Tổng	400	0	2	0	2	0,5

Kết quả tại bảng 3.4 cho thấy, không có thực khuẩn thể nào phân lập được bằng việc sử dụng chủng chỉ thị AI4450 (O139) và chủng chỉ thị Mak757 (O1, El tor). Có 02 chủng phân lập được bằng việc sử dụng chủng chỉ thị H218 (O1, cổ điển) và đều chỉ phân lập được tại Thái Bình từ các mẫu môi gạc tôm lấy từ kênh/ mương.

Bảng 3. 5. Kết quả phân lập thực khuẩn thể tả ở mẫu nước bề mặt theo thời gian, 2018-2019

Năm	Tháng	Loại	Nước bề mặt					
			Chủng chỉ thị			Tổng		
			Mak757 O1, Eltor	H218 O1 Classic	AI4450 O139, Bengal	Số lượng	%	
2018	2	Kênh/Mương				0	0,0	
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0	
		Sông				0	0,0	
	4	Kênh/Mương		2		2	25,0	
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0	
		Sông				0	0,0	
	6	Kênh/Mương		1		1	12,5	
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0	
		Sông		1		1	12,5	
	8	Kênh/Mương	1	2		3	37,5	
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0	
		Sông				0	0,0	
	10	Kênh/Mương				0	0,0	
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0	
		Sông				0	0,0	
	12	Kênh/Mương				0	0,0	
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0	
		Sông				0	0,0	
	2019	2	Kênh/Mương				0	0,0
			Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
			Sông				0	0,0
		4	Kênh/Mương				0	0,0
			Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
			Sông				0	0,0
6		Kênh/Mương				0	0,0	
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0	
		Sông				0	0,0	
8		Kênh/Mương		1		1	12,5	
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0	
		Sông				0	0,0	
Tổng	Số lượng	1	7	0	8	100		
	%	12,5	87,5	0,0	100,0			

Kết quả nêu tại Bảng 3.5. cho thấy, với mẫu nước bề mặt phát hiện 07 thực khuẩn thể tả tại các mẫu được lấy vào tháng 4, tháng 6 và tháng 8 năm

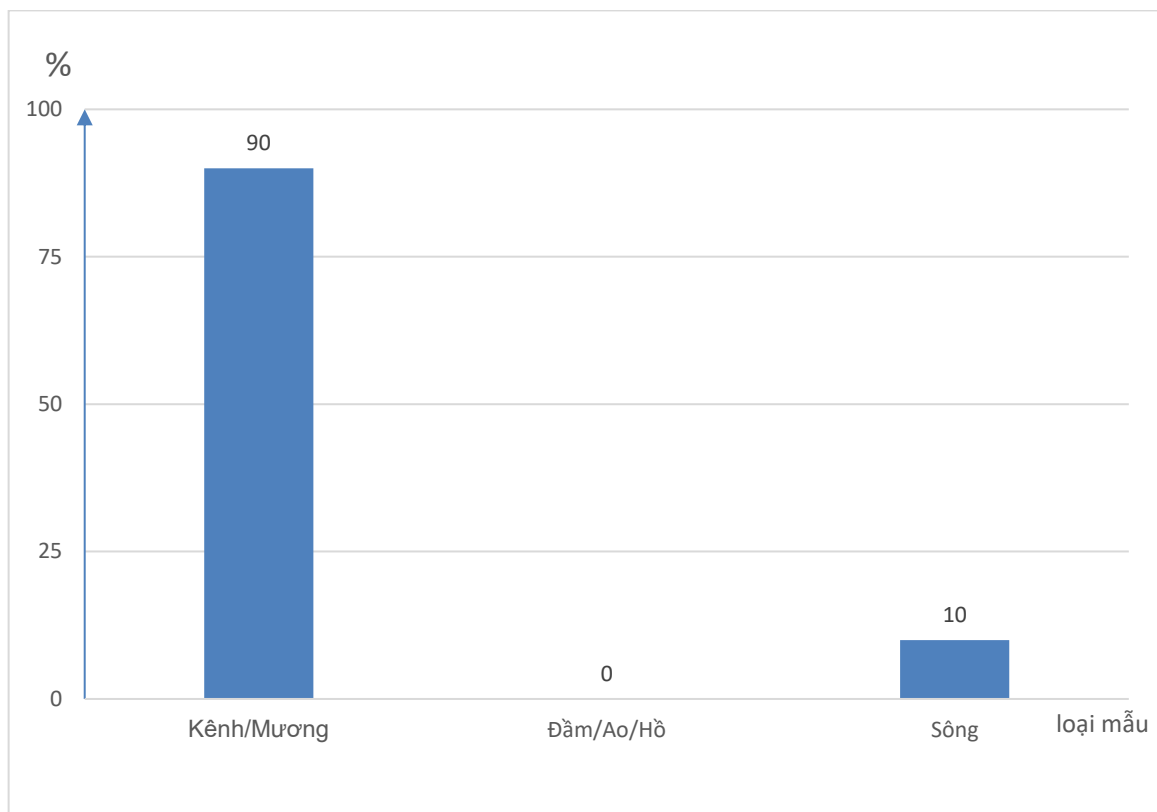
2018; có 01 thực khuẩn thể tả được phát hiện tại mẫu lấy vào tháng 8 năm 2019. Có 01/08 (12,5%) thực khuẩn thể tả phân lập được bằng việc sử dụng chủng chỉ thị Mak757 (O1, El tor), 07/08 (87,5%) thực khuẩn thể tả phân lập được bằng việc sử dụng chủng chỉ thị H218 (O1, cổ điển).

Bảng 3. 6. Kết quả phân lập thực khuẩn thể tả ở mẫu môi gạc tôm theo thời gian, 2018-2019

Năm	Tháng	Loại	Môi gạc tôm				
			Chủng chỉ thị			Tổng	
			<i>Mak757 O1, Eltor</i>	<i>H218 O1, Classic</i>	<i>AI4450 O139, Bengal</i>	Số lượng	%
2018	2	Kênh/Mương		1		1	50,0
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
		Sông				0	0,0
	4	Kênh/Mương				0	0,0
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
		Sông				0	0,0
	6	Kênh/Mương				0	0,0
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
		Sông				0	0,0
	8	Kênh/Mương				0	0,0
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
		Sông				0	0,0
	10	Kênh/Mương		1		1	50,0
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
		Sông				0	0,0
12	Kênh/Mương				0	0,0	
	Đầm/Ao/Hồ				0	0,0	
	Sông				0	0,0	
2019	2	Kênh/Mương				0	0,0
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
		Sông				0	0,0
	4	Kênh/Mương				0	0,0
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
		Sông				0	0,0
	6	Kênh/Mương				0	0,0
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
		Sông				0	0,0
8	Kênh/Mương				0	0,0	

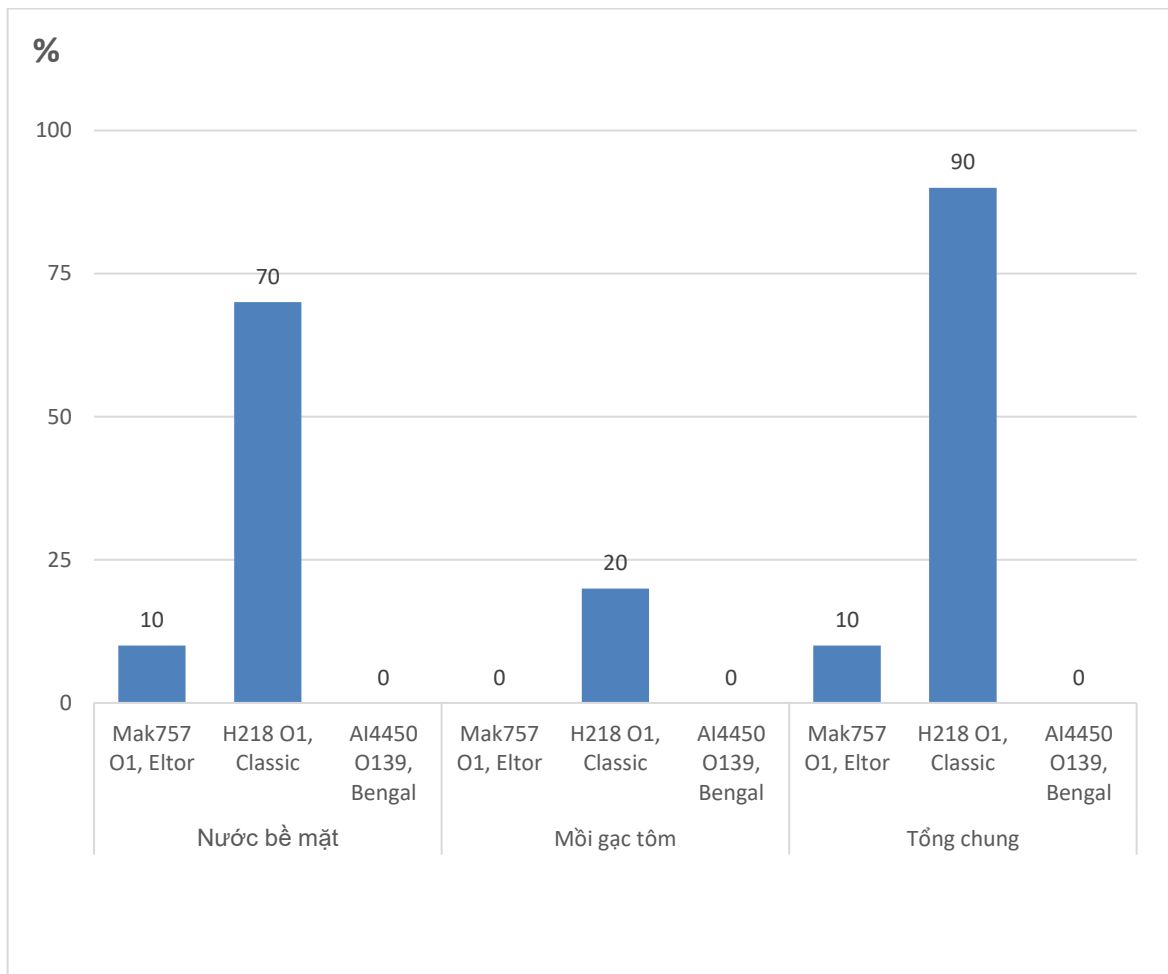
Năm	Tháng	Loại	Môi gạc tôm				
			Chủng chỉ thị			Tổng	
			<i>Mak757 O1, Eltor</i>	<i>H218 O1, Classic</i>	<i>AI4450 O139, Bengal</i>	Số lượng	%
		Đầm/Ao/Hồ				0	0,0
		Sông				0	0,0
Tổng		Số lượng	0	2	0	2	100
		%	0,0	100,0	0,0	100,0	

Theo thời gian lấy mẫu, kết quả phân lập thực khuẩn thể tả ở mẫu môi gạc tôm cho thấy chỉ phát hiện thực khuẩn thể tả tại 02 mẫu được lấy vào tháng 2 và tháng 10 năm 2018 (bảng 3.6). 100,0% thực khuẩn thể tả phân lập được thông qua việc sử dụng chủng chỉ thị H218 (O1, cổ điển).



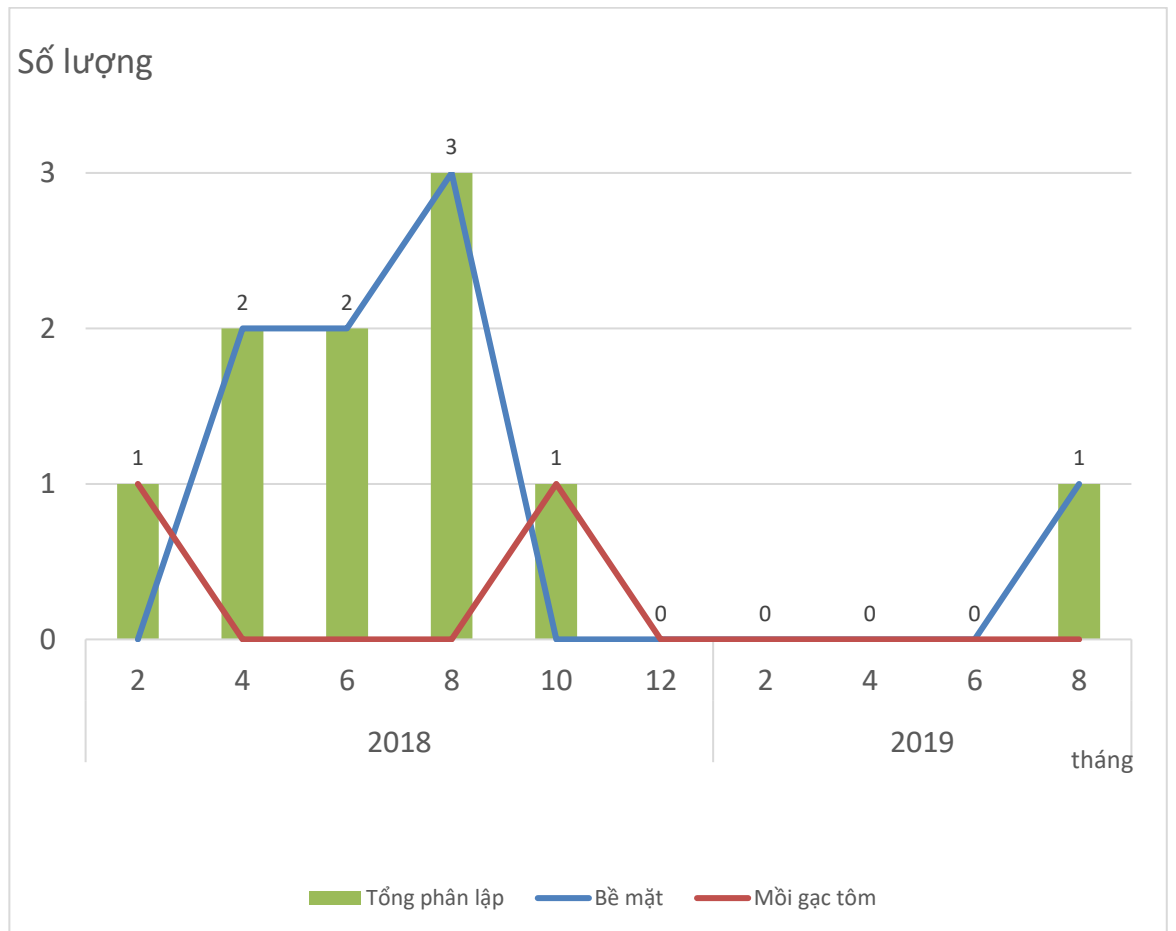
Biểu đồ 3. 1. Kết quả nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả theo loại mẫu thu thập, 2018-2019 (n=10)

Kết quả nêu tại Biểu đồ 3.1 cho thấy không phân lập được thực khuẩn thể tả trong mẫu nước lấy từ đầm/ao/ hồ. 01/10 (10%) thực khuẩn thể tả được phát hiện từ các mẫu nước sông; 09/10 (90%) thực khuẩn thể tả được phát hiện từ các mẫu nước lấy từ kênh/ mương (*Danh mục 10 chủng thực khuẩn thể tả tại Phụ lục 3*).



Biểu đồ 3. 2. Kết quả nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả theo chủng chỉ thị, 2018-2019 (n=10)

Kết quả nêu tại Biểu đồ 3.2 cho thấy, qua phương pháp phân lập có tới 09/10 (90%) thực khuẩn thể tả được phát hiện bằng việc sử dụng chủng chỉ thị H218 (O1, cổ điển); 01/10 (10%) thực khuẩn thể tả được phát hiện bằng việc sử dụng chủng chỉ thị Mak757 (O1, El tor).



Biểu đồ 3. 3. Kết quả nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả theo thời gian, 2018-2019

Biểu đồ 3.3 cho thấy, thực khuẩn thể tả được phát hiện phần lớn vào các tháng 2, tháng 4, tháng 6, tháng 8, tháng 10 năm 2018 và tháng 8 năm 2019. Trong đó, số thực khuẩn thể tả phân lập được vào tháng 4-8 chiếm tỷ lệ cao nhất.

3.1.3. Kết quả xét nghiệm mẫu nước bề mặt, môi gạc tôm bằng phương pháp PCR

Bảng 3. 7. Kết quả xét nghiệm thực khuẩn thể tả dạng sợi trong mẫu nước bề mặt bằng PCR, 2018-2019.

Nước bề mặt		Thực khuẩn thể			
Loại mẫu	Số mẫu	Dạng		Tổng số	
		<i>fs1</i>	<i>fs2</i>	Số lượng	%
Hà Nội					
Kênh/Mương	10	0	0	0	0,0
Đầm/Ao/Hồ	30	0	1	1	1,6
Sông	60	0	0	0	0,0
Tổng	100	0	1	1	1,6
Hải Phòng					
Kênh/Mương	80	8	18	26	41,9
Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0	0,0
Sông	20	3	5	8	12,9
Tổng	100	11	23	34	54,8
Nam Định					
Kênh/Mương	80	6	6	12	19,4
Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0	0,0
Sông	20	0	0	0	0,0
Tổng	100	6	6	12	19,4
Thái Bình					
Kênh/Mương	90	2	10	12	19,4
Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0	0,0
Sông	10	1	2	3	4,8
Tổng	100	3	12	15	24,2
TỔNG CỘNG					
Kênh/Mương	260	16	34	50	80,6
Đầm/Ao/Hồ	30	0	1	1	1,6
Sông	110	4	7	11	17,7
Tổng	400	20	42	62	100,0

Bảng 3.7. cho thấy, có 62/400 (15,5%) mẫu nước bề mặt phát hiện được thực khuẩn thể tả dạng sợi. Gen đặc hiệu đối với thực khuẩn thể tả dạng sợi *fs2* có trong 42/400 (10,5%) mẫu nước bề mặt, gen đặc hiệu đối với thực khuẩn thể tả dạng sợi *fs1* có trong 20/400 (5,0%) mẫu nước bề mặt.

Bảng 3. 8. Kết quả xét nghiệm thực khuẩn thể tả dạng sợi trong mẫu gạc tôm bằng PCR, 2018-2019.

Mẫu gạc tôm		Thực khuẩn thể			
Loại mẫu	Số mẫu	Dạng		Tổng	
		<i>fs1</i>	<i>fs2</i>	Số lượng	%
Hà Nội					
Kênh/Mương	10	0	0	0	0,0
Đầm/Ao/Hồ	30	0	1	1	0,8
Sông	60	0	0	0	0,0
Tổng	100	0	1	1	0,8
Hải Phòng					
Kênh/Mương	80	15	19	34	27,4
Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0	0,0
Sông	20	5	4	9	7,3
Tổng	100	20	23	43	34,7
Nam Định					
Kênh/Mương	80	16	20	36	29,0
Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0	0,0
Sông	20	4	3	7	5,6
Tổng	100	20	23	43	34,7
Thái Bình					
Kênh/Mương	90	15	16	31	25,0
Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0	0,0
Sông	10	2	4	6	4,8
Tổng	100	17	20	37	29,8
TỔNG CỘNG					
Kênh/Mương	260	46	55	101	81,5
Đầm/Ao/Hồ	30	0	1	1	0,8
Sông	110	11	11	22	17,7
Tổng	400	57	67	124	100,0

Bảng 3.8. cho thấy, có 124/400 (31,0%) mẫu môi gạc tôm phát hiện được thực khuẩn thể tả dạng sợi, gen đặc hiệu đối với thực khuẩn thể dạng sợi fs2 có trong 67/400 (16,75%) mẫu, và fs1 là 57/400 (14,25%) mẫu.

Bảng 3. 9. Kết quả xét nghiệm PCR mẫu nước bề mặt theo thời gian, 2018-2019

Năm	Tháng	Loại	Nước bề mặt			
			Dạng		Tổng	
			fs1	fs2	Số lượng	%
2018	2	Kênh/Mương	3	3	6	9,7
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	0	0	0	0,0
	4	Kênh/Mương	3	0	3	4,8
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	2	1	3	4,8
	6	Kênh/Mương	5	9	14	22,6
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	1	1	2	3,2
	8	Kênh/Mương	3	5	8	12,9
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	1	2	3	4,8
	10	Kênh/Mương	0	1	1	1,6
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	0	0	0	0,0
12	Kênh/Mương	0	1	1	1,6	
	Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0	
	Sông	0	0	0	0,0	
2019	2	Kênh/Mương	0	1	1	1,6
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	0	0	0	0,0
	4	Kênh/Mương	0	0	0	0,0
		Đầm/Ao/Hồ	0	1	1	1,6
		Sông	0	0	0	0,0
	6	Kênh/Mương	0	8	8	12,9
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	0	0	0	0,0
8	Kênh/Mương	2	6	8	12,9	
	Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0	
	Sông		3		4,8	
Tổng	Số lượng	20	42	62	100,0	
	%	32,3	67,7	100,0		

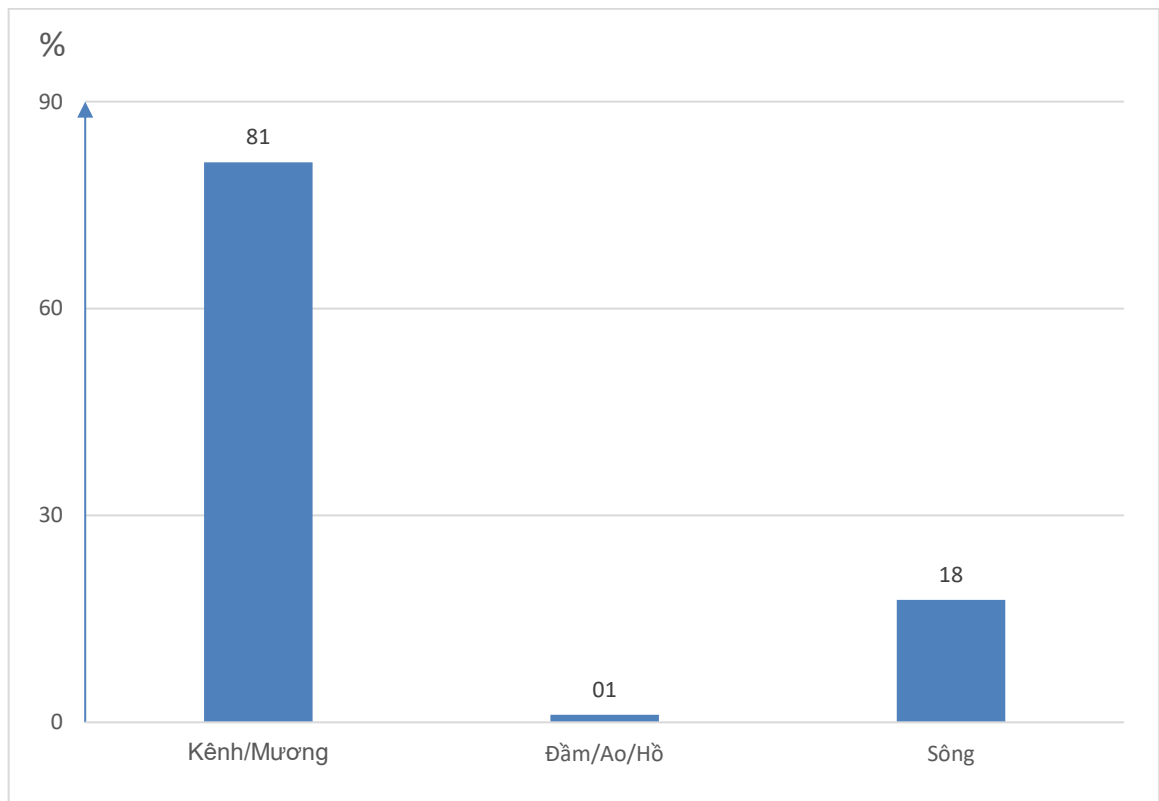
Bảng 3.9. cho thấy, phát hiện được thực khuẩn thể tả dạng sợi ở tất cả các tháng trong năm 2018 và năm 2019 . Trong tổng số 62 mẫu phát hiện được thực khuẩn thể tả, có 20/62 mẫu (32,3%) là thực khuẩn thể tả dạng sợi *fs1*, 42/42 mẫu (67,7%) là thực khuẩn thể tả dạng sợi *fs2*. Tỷ lệ gen *fs2* gần như được phát hiện hàng tháng, còn gen *fs1* chỉ phát hiện vào tháng 2, tháng 4, tháng 6, tháng 8 năm 2018 và tháng 8 năm 2019.

Bảng 3. 10. Kết quả xét nghiệm PCR mẫu môi gạc tôm theo thời gian, 2018-2019

Năm	Tháng	Loại	Môi gạc tôm			
			Dạng		Tổng	
			fs1	fs2	Số lượng	%
2018	2	Kênh/Mương	2	3	5	4,0
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	0	1	1	0,8
	4	Kênh/Mương	10	2	12	9,7
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	4	1	5	4,0
	6	Kênh/Mương	8	8	16	12,9
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	2	1	3	2,4
	8	Kênh/Mương	6	9	15	12,1
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	2	3	5	4,0
	10	Kênh/Mương	1	1	2	1,6
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	0	0	0	0,0
12	Kênh/Mương	2	2	4	3,2	
	Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0	
	Sông	0	1	1	0,8	
2019	2	Kênh/Mương	2	9	11	8,9
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	1	2	3	2,4
	4	Kênh/Mương	11	2	13	10,5
		Đầm/Ao/Hồ	0	1	1	0,8
		Sông	1	0	1	0,8
	6	Kênh/Mương	1	14	15	12,1
		Đầm/Ao/Hồ	0	0	0	0,0
		Sông	0	2	2	1,6
	8	Kênh/Mương	3	5	8	6,5
Đầm/Ao/Hồ		0	0	0	0,0	

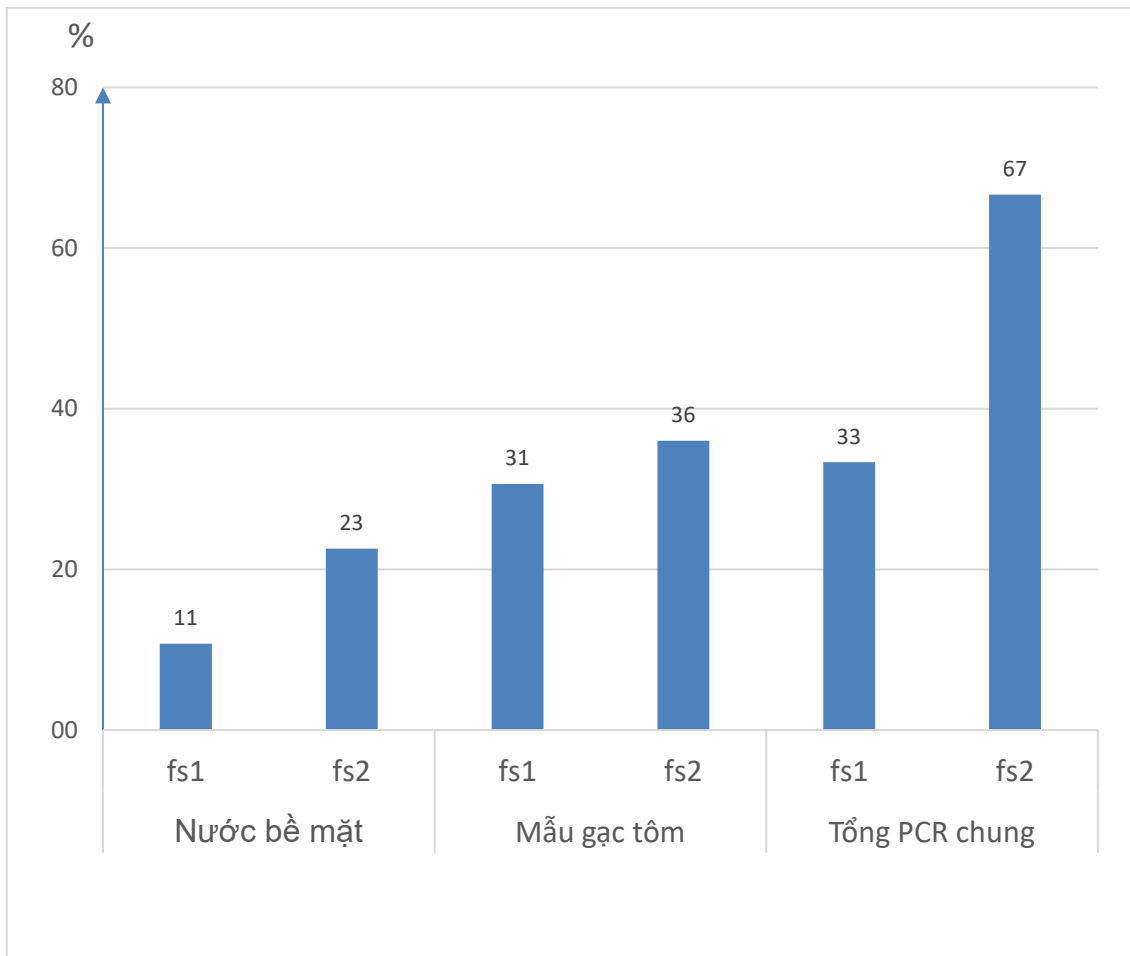
Năm	Tháng	Loại	Môi gạc tôm			
			Dạng		Tổng	
			fs1	fs2	Số lượng	%
		Sông	1	0	1	0,8
Tổng		Số lượng	57	67	124	100,0
		%	46,0	54,0	100,0	

Bảng 3.10. cho thấy, thực khuẩn thể tả dạng sợi được phát hiện ở tất cả các tháng trong năm 2018 và năm 2019. Trong tổng số 124 mẫu phát hiện được, có 57/124 (46,0%) là thực khuẩn thể tả dạng sợi fs1, 67/124 (54,0%) là thực khuẩn thể tả dạng sợi fs2. Gen fs2 và fs1 cũng gần như được phát hiện hàng tháng.



Biểu đồ 3. 4. Kết quả PCR thực khuẩn thể tả theo loại nguồn mẫu nước thu thập, 2018-2019 (n=186)

Kết quả nêu tại Biểu đồ 3.4 cho thấy, qua phương pháp PCR, thực khuẩn thể tả phát hiện thấy nhiều nhất trong mẫu nước kênh/mương (81,2%), tiếp theo là trong mẫu nước sông (17,7%), thấp nhất trong mẫu nước đầm/ao/hồ (1,1%).



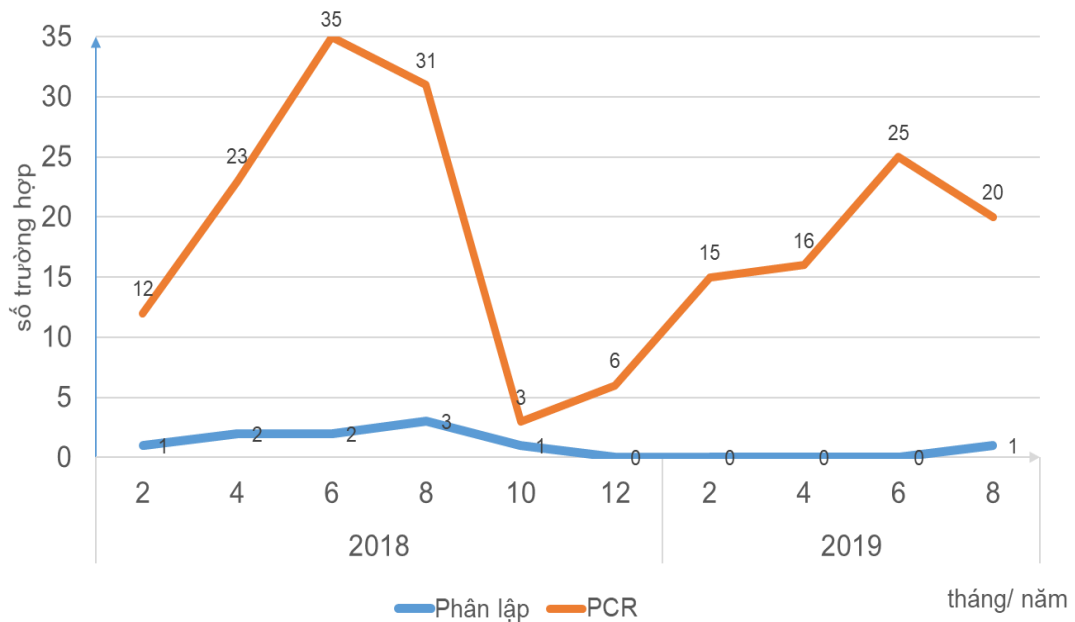
***Biểu đồ 3. 5. Kết quả PCR thực khuẩn thể tả theo chủng, 2018-2019
(n=186)***

Kết quả nêu tại Biểu đồ 3.5 cho thấy, qua phương pháp PCR có tới 66,7% thực khuẩn thể tả dạng sợi *fs2* và 33,3% thực khuẩn thể tả dạng sợi *fs1* được phát hiện.



**Biểu đồ 3. 6. Kết quả PCR thực khuẩn thể tả theo thời gian, 2018-2019
(n=186)**

Biểu đồ 3.6 cho thấy, kết quả PCR thực khuẩn thể tả phân theo thời gian phát hiện thực khuẩn thể tại các tháng trong năm 2019. Số lượng phát hiện bằng mẫu mồi gạo tôm nhiều hơn mẫu nước bề mặt.



Biểu đồ 3. 7. Kết quả xét nghiệm thực khuẩn thể tả theo thời gian, 2018-2019

Kết quả nêu tại Biểu đồ 3.7 trên cho thấy, bằng phương pháp PCR, tháng nào trong năm cũng phát hiện ra thực khuẩn thể tả, tập trung phát hiện nhiều vào tháng 4 và tháng 6 trong năm. Trong khi phương pháp phân lập cho số lượng phát hiện thực khuẩn thể tả thấp hơn và tập trung vào tháng 4 đến tháng 8 năm 2018.

Bảng 3. 11. Kết quả phát hiện thực khuẩn thể tả theo phương pháp xét nghiệm

Phương pháp xét nghiệm		Phát hiện		Không phát hiện		OR (95% CIs)
		Số lượng	%	Số lượng	%	
Phân lập	Môi gạc tôm	2	0,5	398	99,5	0,2 (0,1-1,2)
	Nước bề mặt	8	2,0	392	98,0	
	Tổng	10	1,2	790	99,8	
PCR	Môi gạc tôm	124	31,0	276	69,0	2,4 (1,7-3,5)
	Nước bề mặt	62	15,5	338	84,5	
	Tổng	186	23,2	614	76,8	

Phương pháp xét nghiệm		Phát hiện		Không phát hiện		OR (95% CIs)
		Số lượng	%	Số lượng	%	
Phương pháp	PCR	186	23,2	614	76,8	23,9 (12,6-51,1)
	Phân lập	10	1,2	790	99,8	
	Tổng	196	12,2	1404	87,8	

Kết quả xét nghiệm phát hiện được thực khuẩn thể tả cho thấy về loại mẫu, mẫu môi gạc tôm có giá trị hơn, mặc dù trong phương pháp phân lập sự khác biệt không có ý nghĩa nhưng với phương pháp PCR loại mẫu này phát hiện thực khuẩn thể tả gấp 2,4 lần (95%CI: 1,7-3,5) so với mẫu nước bề mặt. Về phương pháp xét nghiệm, phương pháp PCR có giá trị hơn khi phát hiện thực khuẩn thể tả gấp 23,9 lần (95%CI:12,6-51,1) so với phương pháp phân lập.

3.2. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong phòng thí nghiệm và trên thực địa cộng đồng ở các môi trường nước khác nhau

3.2.1. Kết quả thử nghiệm khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả với một số chủng vi khuẩn tả và vi khuẩn đường ruột khác

Bảng 3. 12. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả với một số chủng vi khuẩn tả

STT		Vi khuẩn thử nghiệm													Số lượng (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	SL	%
Chủng thực khuẩn thể tả	VP01	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	7	54,9
	VP02	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2	15,4
	VP03	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	4	30,8
	VP04	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	8	61,5
	VP05	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3	23,1
	VP06	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	15,4
	VP07	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3	23,1
	VP08	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	4	30,8
	VP09	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3	23,1
	VP10	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3	23,1

STT	Vi khuẩn thử nghiệm													Số lượng (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	SL	%
VP11	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3	23,1
VP12	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3	23,1
VP13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	2	15,4
VP14	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	11	84,6
VP15	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	5	38,5
VP16	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	7	54,9
VP17	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	15,4
VP18	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	15,4
VP19	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	8	61,5
VP20	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	46,2
VP21	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	6	46,2
VP22	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	15,4
VP23	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	6	46,2
VP24	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	15,4
VP25	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	5	38,5
VP26	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	7	54,9
VP27	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	5	38,5
VP28	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	9	69,2
VP29	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	8	61,5
VP30	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	30,8
VP31	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	4	30,8
VP32	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	4	30,8
VP33	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	5	38,5
VP34	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	3	23,1
VP35	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	4	30,8
VP36	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3	23,1
Số lượng (%)	24 (66,7)	13 (36,1)	31 (86,1)	15 (41,7)	14 (38,9)	15 (41,7)	6 (16,7)	6 (16,7)	0 (0,0)	11 (30,6)	8 (22,2)	7 (19,4)	12 (33,3)		

Ghi chú: (-) Không có vật tan; (+): có vật tan

1: V. cholerae O1, Cổ điển; Bgd17. 2: V. cholerae O1, Cổ điển; Vc154. 3: V. cholerae O1, Cổ điển; H218. 4: V. cholerae O1, El tor; K23. 5: V. cholerae O1, El tor; A107. 6: V. cholerae O1, El tor; Mak757. 7: V. cholerae O139, Bengal; AII837. 8: V. cholerae O139, Bengal; AII855. 9: V. cholerae O139, Bengal; AI4450. 10: V. cholerae O1, El tor; VN048p/07. 11: V. cholerae O1, El tor; VN29/95. 12: V. cholerae O1, El tor; VN293/03VN. 13: V. cholerae O1, El tor; VN02P/10.

Kết quả tại bảng 3.12 cho thấy, không có chủng thực khuẩn thể tả nào ly giải các chủng vi khuẩn tả O139 Bengal; chủng vi khuẩn tả H218 có số thực khuẩn thể ly giải cao nhất chiếm 86,11% (31/36 chủng); tiếp theo là chủng vi khuẩn tả cổ điển Bgd17 có số lượng thực khuẩn thể ly giải chiếm 66,67%

(24/36 chủng); các chủng vi khuẩn tả El tor phân lập được từ các vụ đại dịch tả ở Ấn Độ, Nhật Bản, Bangladesh có số thực khuẩn thể tả cảm nhiễm/ly giải từ 38% đến 41%; chủng vi khuẩn tả phân lập tại các vụ dịch tả ở Việt Nam trong các năm 1995, 2003, 2007 và 2010 có số thực khuẩn thể tả cảm nhiễm/ly giải từ 19,4% đến 33,3%.

Thực khuẩn thể VP14 và VP28 là 2 chủng thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải cả 4 loại chủng vi khuẩn tả cổ điển, El tor, Bengal và chủng tả phân lập tại các vụ dịch tả ở Việt Nam; trong đó chủng VP14 có khả năng ly giải 11/13 chủng vi khuẩn tham gia thử nghiệm bao gồm 2/3 chủng vi khuẩn tả O1 cổ điển, 3/3 chủng vi khuẩn tả O1 El tor, 2/3 chủng vi khuẩn tả O139 Bengal, và 4/4 chủng vi khuẩn tả thu thập tại 04 vụ dịch tả ở Việt Nam trong các năm 1995, 2003, 2007 và 2010.

Không có chủng thực khuẩn thể tả nào trong tổng số 36 chủng tham gia nghiên cứu có thể ly giải được toàn bộ 13 chủng vi khuẩn tả sử dụng trong nghiên cứu.

Các chủng thực khuẩn thể tả VP01, VP04, VP16, VP29 có khả năng ly giải một số chủng vi khuẩn tả cổ điển, El tor và chủng vi khuẩn tả phân lập tại Việt Nam.

Các thực khuẩn thể tả VP06, VP17, VP22, VP24 chỉ ly giải một số vi khuẩn tả cổ điển trong nghiên cứu, không xác định ly giải các chủng vi khuẩn tả O1 El tor, O139 Bengal và các chủng vi khuẩn tả phân lập tại Việt Nam.

Các thực khuẩn thể tả VP09, VP26, VP27, VP36 chỉ ly giải một số vi khuẩn tả O1 cổ điển, O1 El tor trong nghiên cứu, không xác định ly giải các chủng vi khuẩn tả O139 Bengal và các chủng vi khuẩn tả phân lập tại Việt Nam.

Các thực khuẩn thể tả VP19, VP20 chỉ ly giải một số vi khuẩn tả O1 cổ điển, O1 El tor, và O139 Bengal trong nghiên cứu, không xác định ly giải các

chủng vi khuẩn tả các chủng vi khuẩn tả phân lập tại Việt Nam.

Thực khuẩn thể tả VP25 chỉ ly giải một số vi khuẩn tả O1 El tor và O139 Bengal trong nghiên cứu, không xác định ly giải các chủng vi khuẩn tả O1 cổ điển và các chủng vi khuẩn tả phân lập tại Việt Nam.

Bảng 3. 13. Thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể với một số loại vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy khác

Thực khuẩn thể/ Chủng chỉ thị	Vi khuẩn thử nghiệm						
	1	2	3	4	5	6	7
VP01	-	-	-	-	-	-	-
VP02	-	-	-	-	-	-	-
VP03	-	-	-	-	-	-	-
VP04	-	-	-	-	-	-	-
VP05	-	-	-	-	-	-	-
VP06	-	-	-	-	-	-	-
VP07	-	-	-	-	-	-	-
VP08	-	-	-	-	-	-	-
VP09	-	-	-	-	-	-	-
VP10	-	-	-	-	-	-	-
VP11	-	-	-	-	-	-	-
VP12	-	-	-	-	-	-	-
VP13	-	-	-	-	-	-	-
VP14	-	-	-	-	-	-	-
VP15	-	-	-	-	-	-	-
VP16	-	-	-	-	-	-	-
VP17	-	-	-	-	-	-	-
VP18	-	-	-	-	-	-	-
VP19	-	-	-	-	-	-	-
VP20	-	-	-	-	-	-	-
VP21	-	-	-	-	-	-	-
VP22	-	-	-	-	-	-	-
VP23	-	-	-	-	-	-	-
VP24	-	-	-	-	-	-	-
VP25	-	-	-	-	-	-	-
VP26	-	-	-	-	-	-	-
VP27	-	-	-	-	-	-	-
VP28	-	-	-	-	-	-	-
VP29	-	-	-	-	-	-	-
VP30	-	-	-	-	-	-	-
VP31	-	-	-	-	-	-	-
VP32	-	-	-	-	-	-	-
VP33	-	-	-	-	-	-	-
VP34	-	-	-	-	-	-	-
VP35	-	-	-	-	-	-	-
VP36	-	-	-	-	-	-	-

Thực khuẩn thể/Chủng chỉ thị	Vi khuẩn thử nghiệm						
	1	2	3	4	5	6	7
n(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Ghi chú: (-): Không ly giải – không có vết tan; (+): Ly giải – có 1 hoặc nhiều vết tan

1: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. 2: *V. parahaemolyticus* F1 – BN tiêu chảy. 3: *V. parahaemolyticus* ShTb2 – Đầm nuôi tôm. 4: *E. coli* ATCC 25922. 5: *S. flexneri* 2b ATCC 12022. 6: *S. enteritidis* ATCC 13076. 7: *S. aureus* ATCC 11632.

Thử nghiệm khả năng ly giải của 36 chủng thực khuẩn thể phân lập được từ mẫu nước tại các tỉnh/thành phố Hải Phòng và Thái Bình với các chủng vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác. Kết quả nêu tại Bảng 3.13. cho thấy, các chủng thực khuẩn thể thử nghiệm không ly giải các chủng vi khuẩn *V. parahemolyticus* hay chủng vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác.

3.2.2. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể ở các điều kiện pha loãng mật độ

Bảng 3. 14. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể ở các điều kiện pha loãng khác nhau

Thực khuẩn thể/Chủng chỉ thị	Pha loãng									
	(10 ⁻¹)	(10 ⁻²)	(10 ⁻³)	(10 ⁻⁴)	(10 ⁻⁵)	(10 ⁻⁶)	(10 ⁻⁷)	(10 ⁻⁸)	(10 ⁻⁹)	(10 ⁻¹⁰)
VP01	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP02	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP03	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP04	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP05	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP06	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP07	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP08	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP09	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP10	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP11	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP12	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP13	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP14	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP15	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP16	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP17	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP18	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP19	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP20	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP21	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP22	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP23	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0

Thực khuẩn thể/Chủng chỉ thị	Pha loãng									
	(10 ⁻¹)	(10 ⁻²)	(10 ⁻³)	(10 ⁻⁴)	(10 ⁻⁵)	(10 ⁻⁶)	(10 ⁻⁷)	(10 ⁻⁸)	(10 ⁻⁹)	(10 ⁻¹⁰)
VP24	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP25	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP26	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP27	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP28	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP29	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP30	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP31	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP32	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP33	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP34	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP35	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
VP36	3+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0	0	0
Số lượng (%)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Ghi chú: 0: Không có vết tan; 1+: có <10 vết tan trong vùng nhỏ mẫu; 2+ có >10 vết tan trong vùng nhỏ mẫu, các vết tan còn rõ các ranh giới; 3+: Có nhiều vết tan trong vùng nhỏ mẫu, các vết tan không rõ ranh giới.

Thử nghiệm khả năng ly giải của thực khuẩn thể ở các điều kiện pha loãng khác nhau với vi khuẩn tả H218 (chủng tả cổ điển) và Mak757 (chủng tả El tor). Kết quả nêu tại Bảng 3.14. cho thấy, thực khuẩn thể đã ly giải với độ pha loãng từ 10⁻¹ đến 10⁻⁶ là 100% trong khi với độ pha loãng từ 10⁻⁷ đến 10⁻¹⁰ vi khuẩn không có khả năng ly giải.

3.2.3. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể với các điều kiện pH môi trường khác nhau

Bảng 3. 15. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể với các điều kiện pH môi trường khác nhau

Thực khuẩn thể/ Chủng chỉ thị	pH						
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
VP01	2	3	3	3	3	3	2
VP02	2	3	3	3	3	3	2
VP03	2	3	3	3	3	3	2
VP04	2	3	3	3	3	3	2
VP05	2	3	3	3	3	3	2
VP06	2	3	3	3	3	3	2
VP07	2	3	3	3	3	3	2
VP08	2	3	3	3	3	3	2

Thực khuẩn thể/ Chứng chỉ thị	pH						
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
VP09	2	3	3	3	3	3	2
VP10	2	3	3	3	3	3	2
VP11	2	3	3	3	3	3	2
VP12	2	3	3	3	3	3	2
VP13	2	3	3	3	3	3	2
VP14	2	3	3	3	3	3	2
VP15	2	3	3	3	3	3	2
VP16	2	3	3	3	3	3	2
VP17	2	3	3	3	3	3	2
VP18	2	3	3	3	3	3	2
VP19	2	3	3	3	3	3	2
VP20	2	3	3	3	3	3	2
VP21	2	3	3	3	3	3	2
VP22	2	3	3	3	3	3	2
VP23	2	3	3	3	3	3	2
VP24	2	3	3	3	3	3	2
VP25	2	3	3	3	3	3	2
VP26	2	3	3	3	3	3	2
VP27	2	3	3	3	3	3	2
VP28	2	3	3	3	3	3	2
VP29	2	3	3	3	3	3	2
VP30	2	3	3	3	3	3	2
VP31	2	3	3	3	3	3	2
VP32	2	3	3	3	3	3	2
VP33	2	3	3	3	3	3	2
VP34	2	3	3	3	3	3	2
VP35	2	3	3	3	3	3	2
VP36	2	3	3	3	3	3	2
n(%)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	36 (100)

Ghi chú: 0: Không có vệt tan; 1+: có <10 vệt tan trong vùng nhỏ mẫu; 2+ có >10 vệt tan trong vùng nhỏ mẫu, các vệt tan còn rõ các ranh giới; 3+: Có nhiều vệt tan trong vùng nhỏ mẫu, các vệt tan không rõ ranh giới

Thử nghiệm khả năng ly giải của thực khuẩn thể ở các điều kiện môi trường pH khác nhau cho thấy, 100% thực khuẩn thể có khả năng ly giải ở điều kiện môi trường có pH 4,0 đến pH 10,0. (Bảng 3.15)

3.2.4. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể với các điều kiện nhiệt độ môi trường khác nhau.

Bảng 3.16. Kết quả thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau

Thực khuẩn thể/ Chung chỉ thị	Nhiệt độ							
	4°C	15°C	25°C	30°C	37°C	41°C	45°C	55°C
VP01	0	1	2	3	3	2	0	0
VP02	0	1	2	3	3	2	0	0
VP03	0	1	2	3	3	2	0	0
VP04	0	1	2	3	3	2	0	0
VP05	0	1	2	3	3	2	0	0
VP06	0	1	2	3	3	2	0	0
VP07	0	1	2	3	3	2	0	0
VP08	0	1	2	3	3	2	0	0
VP09	0	1	2	3	3	2	0	0
VP10	0	1	2	3	3	2	0	0
VP11	0	1	2	3	3	2	0	0
VP12	0	1	2	3	3	2	0	0
VP13	0	1	2	3	3	2	0	0
VP14	0	1	2	3	3	2	0	0
VP15	0	1	2	3	3	2	0	0
VP16	0	1	2	3	3	2	0	0
VP17	0	1	2	3	3	2	0	0
VP18	0	1	2	3	3	2	0	0
VP19	0	1	2	3	3	2	0	0
VP20	0	1	2	3	3	2	0	0
VP21	0	1	2	3	3	2	0	0
VP22	0	1	2	3	3	2	0	0
VP23	0	1	2	3	3	2	0	0
VP24	0	1	2	3	3	2	0	0
VP25	0	1	2	3	3	2	0	0
VP26	0	1	2	3	3	2	0	0
VP27	0	1	2	3	3	2	0	0
VP28	0	1	2	3	3	2	0	0
VP29	0	1	2	3	3	2	0	0
VP30	0	1	2	3	3	2	0	0
VP31	0	1	2	3	3	2	0	0
VP32	0	1	2	3	3	2	0	0
VP33	0	1	2	3	3	2	0	0
VP34	0	1	2	3	3	2	0	0
VP35	0	1	2	3	3	2	0	0
VP36	0	1	2	3	3	2	0	0
n(%)	0 (0)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	0 (0)	0 (0)

Ghi chú 0: Không có vết tan; 1+: có <10 vết tan trong vùng nhỏ mẫu; 2+ có >10 vết tan trong vùng nhỏ mẫu, các vết tan còn rõ các ranh giới; 3+: Có nhiều vết tan trong vùng nhỏ mẫu, các vết tan không rõ ranh giới

Kết quả thử nghiệm nêu tại Bảng 3.16. cho thấy, khả năng ly giải của

thực khuẩn thể phụ thuộc rất nhiều vào nhiệt độ môi trường. Thực khuẩn thể tả không thể phát triển và thực hiện ly giải các vi khuẩn tả ở điều kiện nhiệt độ môi trường 4°C, trong khi ở 15°C, 25°C và 30°C, hoạt động ly giải đã được thực hiện nhưng hơi chậm trễ. Trong khi đó, với điều kiện nhiệt độ 45°C và 55°C đã hạn chế và gây ra sự bất hoạt thực sự của vi khuẩn; nhiệt độ 30°C và 37°C là nhiệt độ lý tưởng cho thực khuẩn thể hoạt động.

3.2.5. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả đối với nguồn nước ngoại cảnh cộng đồng, năm 2020

Bảng 3.17. Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong môi trường nước máy, năm 2020

Loại mẫu nước	Thời gian	Mật độ thực khuẩn thể			
		Hà Nội	Thái Bình	Hải Phòng	Nam Định
		pH: 7,3 Muối: 0,01 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,1 Muối: 0,01 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,5 Muối: 0,01 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,2 Muối: 0,01 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C
Nước máy	0	3,9 x 10 ⁹	3,5 x 10 ⁹	3,8 x 10 ⁹	3,6 x 10 ⁹
	1 tuần	3,4 x 10 ⁷	3,0 x 10 ⁷	3,6 x 10 ⁷	3,2 x 10 ⁷
	2 tuần	2,5 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁵
	1 tháng	3,1 x 10 ³	3,5 x 10 ³	3,2x 10 ³	2,5 x 10 ³
	3 tháng	0	0	0	0
	6 tháng	0	0	0	0

Kết quả nêu tại Bảng 3.17 về thử nghiệm thời gian tồn tại của thực khuẩn thể tả VP04 ở các điều kiện nguồn nước máy cho thấy, thực khuẩn thể tả có khả năng tồn tại đến 01 tháng, thực khuẩn thể tả giảm nhiều sau 02 tuần thử nghiệm.

Bảng 3.18. Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong môi trường nước sông/suối, năm 2020

Loại mẫu nước	Thời gian	Mật độ thực khuẩn thể			
		Hà Nội	Thái Bình	Hải Phòng	Nam Định
		pH: 7,8 Muối: 0,06 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,9 Muối: 0,09 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 8,1 Muối: 0,08 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,9 Muối: 0,05 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C
Nước sông, suối	0	3,7 x 10 ⁹	3,7 x 10 ⁹	3,4 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁹
	1 tuần	3,2 x 10 ⁸	3,5 x 10 ⁸	2,9 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁸
	2 tuần	2,8 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁷
	1 tháng	1,9 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶
	3 tháng	3,7 x 10 ³	3,2 x 10 ³	3,6 x 10 ³	3,5 x 10 ³
	6 tháng	0	0	0	0

Kết quả nêu tại Bảng 3.18 cho thấy, đối với nguồn nước sông/suối, thực khuẩn thể tả có khả năng tồn tại đến 03 tháng, thực khuẩn thể tả giảm nhiều sau 01 tháng thử nghiệm.

Bảng 3. 19. Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong môi trường nước giếng, năm 2020

Loại mẫu nước	Thời gian	Mật độ thực khuẩn thể			
		Hà Nội	Thái Bình	Hải Phòng	Nam Định
		pH: 7,4 Muối: 0,05 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,5 Muối: 0,07 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,4 Muối: 0,08 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,6 Muối: 0,04 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C
Nước giếng	0	3,9 x 10 ⁹	3,8 x 10 ⁹	3,7 x 10 ⁹	3,8 x 10 ⁹
	1 tuần	3,6 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁸
	2 tuần	2,5 x 10 ⁷	2,8 x 10 ⁷	2,7 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁷
	1 tháng	2,8 x 10 ⁶	2,9 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶
	3 tháng	3,2 x 10 ³	3,4 x 10 ³	3,6 x 10 ³	3,9 x 10 ³
	6 tháng	0	0	0	0

Kết quả nêu tại Bảng 3.19 cho thấy, đối với nguồn nước giếng, thực khuẩn thể tả có khả năng tồn tại đến 03 tháng và giảm nhiều sau 01 tháng thử nghiệm.

Bảng 3. 20. Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong môi trường nước mưa, năm 2020

Loại mẫu nước	Thời gian	Mật độ thực khuẩn thể			
		Hà Nội	Thái Bình	Hải Phòng	Nam Định
		pH: 7,0 Muối: 0,01 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,1 Muối: 0,01 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,0 Muối: 0,01 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 6,9 Muối: 0,01 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C
Nước mưa	0	3,6 x 10 ⁹	3,8 x 10 ⁹	3,7 x 10 ⁹	4,1 x 10 ⁹
	1 tuần	3,0 x 10 ⁷	3,2 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁷	3,6 x 10 ⁷
	2 tuần	2,2 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁵
	1 tháng	2,8 x 10 ³	2,4x 10 ³	2,9 x 10 ³	3,1 x 10 ³
	3 tháng	0	0	0	0
	6 tháng	0	0	0	0

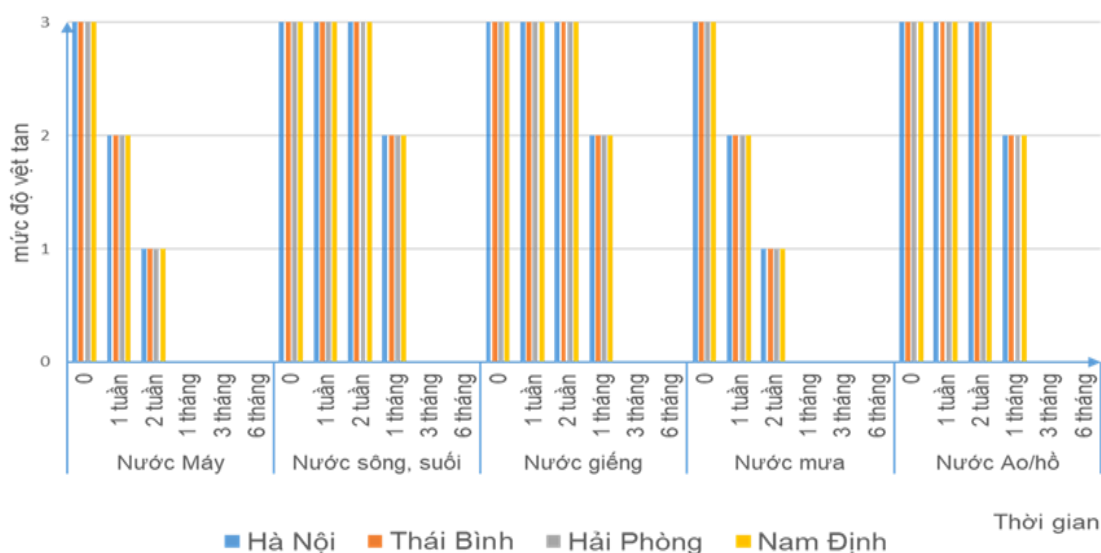
Kết quả nêu tại Bảng 3.20 cho thấy, đối với nguồn nước mưa, thực khuẩn thể tả có khả năng tồn tại đến 01 tháng, thực khuẩn thể tả giảm nhiều sau 02 tuần thử nghiệm.

Bảng 3. 21. Thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong môi trường nước ao/hồ, năm 2020

Loại mẫu nước	Thời gian	Mật độ thực khuẩn thể			
		Hà Nội	Thái Bình	Hải Phòng	Nam Định
		pH: 7,8 Muối: 0,05 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,9 Muối: 0,1 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 8,1 Muối: 0,09 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,9 Muối: 0,06 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C
Nước Ao/hồ	0	3,4 x 10 ⁹	3,5 x 10 ⁹	3,7 x 10 ⁹	4,4 x 10 ⁹
	1 tuần	2,6 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁸	3,4 x 10 ⁸
	2 tuần	2,8 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁷	3,2x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁷

Loại mẫu nước	Thời gian	Mật độ thực khuẩn thể			
		Hà Nội	Thái Bình	Hải Phòng	Nam Định
		pH: 7,8 Muối: 0,05 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,9 Muối: 0,1 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 8,1 Muối: 0,09 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C	pH: 7,9 Muối: 0,06 ppt T ₀ : 20-40 ⁰ C
1 tháng	2,4 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁶	
3 tháng	3,0 x 10 ³	3,3 x 10 ³	3,5 x 10 ³	3,6 x 10 ³	
6 tháng	0	0	0	0	

Kết quả nêu tại Bảng 3.21 cho thấy, đối với nguồn nước ao/hồ, thực khuẩn thể tả có khả năng tồn tại đến 03 tháng, và giảm nhiều sau 01 tháng thử nghiệm.



Thời gian	Điều kiện nước			
	Hà Nội	Thái Bình	Hải Phòng	Nam Định
Nước Máy	pH: 7,3 Muối: 0,01 ppt	pH: 7,1 Muối: 0,01 ppt	pH: 7,5 Muối: 0,01 ppt	pH: 7,2 Muối: 0,01 ppt
Nước sông, suối	pH: 7,8 Muối: 0,06 ppt	pH: 7,9 Muối: 0,09 ppt	pH: 8,1 Muối: 0,08 ppt	pH: 7,9 Muối: 0,05 ppt
Nước giếng	pH: 7,4 Muối: 0,05 ppt	pH: 7,5 Muối: 0,07 ppt	pH: 7,4 Muối: 0,08 ppt	pH: 7,6 Muối: 0,04 ppt
Nước mưa	pH: 7,0 Muối: 0,01 ppt	pH: 7,1 Muối: 0,01 ppt	pH: 7,0 Muối: 0,01 ppt	pH: 6,9 Muối: 0,01 ppt
Nước Ao/hồ	pH: 7,8 Muối: 0,05 ppt	pH: 7,9 Muối: 0,1 ppt	pH: 8,1 Muối: 0,09 ppt	pH: 7,9 Muối: 0,06 ppt

Ghi chú: Mức độ vết tan

0: Không có vết tan;

1: có <10 vết tan trong vùng nhỏ mẫu;

2 có >10 vết tan trong vùng nhỏ mẫu, các vết tan còn rõ các ranh giới;

3: Có nhiều vết tan trong vùng nhỏ mẫu, các vết tan không rõ ranh giới

Biểu đồ 3. 8. Kết quả thử nghiệm khả năng ly giải của thực khuẩn thể VP04 đối với các nguồn nước ngoại cảnh cộng đồng, năm 2020

Kết quả nêu tại Biểu đồ 3.8 cho thấy về khả năng ly giải của thực khuẩn thể VP04 đối với các nguồn nước ngoại cảnh cộng đồng như sau:

- Đối với nguồn nước máy, thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải đến 02 tuần, thực khuẩn thể tả giảm khả năng ly giải nhiều sau 01 tuần thử nghiệm.

- Đối với nguồn nước sông/suối, thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải đến 01 tháng, thực khuẩn thể tả giảm khả năng ly giải nhiều sau 02 tuần thử nghiệm.

- Đối với nguồn nước giếng, thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải đến 01 tháng, thực khuẩn thể tả giảm khả năng ly giải nhiều sau 02 tuần thử nghiệm.

- Đối với nguồn nước mưa, thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải đến 02 tuần, thực khuẩn thể tả giảm khả năng ly giải nhiều sau 01 tuần thử nghiệm.

- Đối với nguồn nước ao/hồ, thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải đến 01 tháng, thực khuẩn thể tả giảm khả năng ly giải nhiều sau 02 tuần thử nghiệm.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoại cảnh

4.1.1. Một số đặc điểm chung về mẫu nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 02/2018 đến tháng 8/2019 tại 04 tỉnh/thành phố (Hà Nội, Hải Phòng, Nam Định và Thái Bình) với tổng số mẫu là 800 mẫu trong đó gồm 400 mẫu nước bề mặt và 400 mẫu môi gạc tôm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, số lượng mẫu lấy tại kênh (muong) nước chiếm số lượng lớn với 65,0%, tiếp theo là sông (27,5%) và hồ nước (7,5%). Nhóm nghiên cứu tiến hành lấy mẫu tại các vị trí này dựa trên các tiêu chuẩn lựa chọn địa điểm nghiên cứu bao gồm: gần nhà bệnh nhân tả khởi phát đầu tiên của các vụ dịch tả trong những năm trước đây, các vị trí thuộc vùng cửa sông ven biển, là nơi thích hợp cho sự tồn tại và phát triển của các chủng tả và thực khuẩn tả. Điều này tương đồng với các vị trí thu thập mẫu trong các nghiên cứu khác về thực khuẩn tả như nghiên cứu của Godfrey Bwire và cộng sự tại Uganda (2020) [39] 318 mẫu nước đã được thử nghiệm từ 27 địa điểm gồm hồ, sông, kênh tưới tiêu, suối và ao. Nước tự nhiên trên bề mặt là nguồn nước chính để sinh tồn của loài người trên thế giới vì dễ tiếp cận nhất, tuy nhiên, cùng một vùng nước bề mặt cũng là môi trường sống tự nhiên của nhiều loài sinh vật/vi sinh vật. Trong đó, vẫn tồn tại một số loại sinh vật gây bệnh truyền nhiễm nguy hiểm cho con người như bệnh dịch tả, thương hàn, ... Nguồn nước bề mặt bao gồm hồ, sông, suối, kênh, rạch và ao. Những nguồn nước mặt này thường dễ bị ô nhiễm do hoạt động của con người, động vật và yếu tố tự nhiên. Một đợt bùng phát dịch tả do uống nước hồ bị nhiễm phân người ở làng Kaiso, quận Hoima, Tây Uganda vào tháng 10/2015 báo cáo tất cả những người được xác định mắc bệnh tả (61/61) đều lấy nước uống từ các điểm ven hồ bị ô nhiễm do rãnh nước cuốn phân theo hệ thống dòng chảy vào hồ [39]. Do đó, từ các kênh, rãnh bị ô nhiễm

theo dòng chảy đổ ra hồ, ao, sông, suối và gây ra hiện tượng ô nhiễm dòng nước hàng loạt. Khi con người sử dụng những nguồn nước này có thể trực tiếp hoặc gián tiếp mắc phải các bệnh truyền nhiễm nói chung và bệnh tả nói riêng. Cho nên việc lấy mẫu từ những địa điểm như vậy là phù hợp để có thể thu được mẫu cho nghiên cứu có kết quả.

Bốn tỉnh/thành phố được chọn để thu thập mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi đều là các địa điểm có một số vụ dịch tả xuất hiện tại Việt Nam trong những năm trước đây. Trong các năm từ năm 2000 đến năm 2002 ghi nhận các vụ dịch tả lẻ tẻ tại các tỉnh/thành phố Hải Phòng, Nam Định và Thái Bình. Giai đoạn năm 2005-2006, cả nước không ghi nhận trường hợp nào. Từ cuối năm 2007, ca bệnh đầu tiên được phát hiện tại Hà Nội. Hà Nội là thành phố có mật độ dân số đông, là khởi nguồn của 02 vụ dịch tả năm 2004 và năm 2007. Cuối năm 2007 dịch tiêu chảy cấp lại xuất hiện tại Thành phố Hà Nội và 13 tỉnh vùng đồng bằng Bắc Bộ với 1.991 ca có triệu chứng lâm sàng và 295 trường hợp được khẳng định dương tính với phẩy khuẩn tả, sau mấy tháng nỗ lực phòng, chống đã hoàn toàn khống chế được dịch tiêu chảy cấp [2].

Trong thời gian nghiên cứu năm 2018 và năm 2019, nhóm nghiên cứu đã tiến hành thu thập mẫu theo từng đợt tại các tỉnh/thành phố. Cụ thể, mỗi đợt cách nhau 02 tháng bắt đầu từ tháng 2 năm 2018 đến tháng 8 năm 2019 tại 4 tỉnh/thành phố (Hà Nội, Hải Phòng, Thái Bình, Nam Định). Điều này dẫn đến sự chênh lệch về tổng số mẫu thu thập giữa các tháng trong năm. Tuy nhiên, thực khuẩn thể là một trong những thể vi sinh vật sống phổ biến và đa dạng trong sinh quyển, có thể tồn tại trong môi trường ngoại cảnh và nước sinh hoạt từ 01 đến 03 tháng [14]. Đây là lý do tại sao nhóm nghiên cứu tiến hành thu thập mẫu theo từng đợt cách nhau 02 tháng, để đảm bảo tiêu chuẩn nghiên cứu đối với các mẫu nước và mẫu môi gạc tôm.

4.1.2. Sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoại cảnh

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy phát hiện thực khuẩn thể tả tại cả 4 điểm nghiên cứu. Nghiên cứu tiến hành nuôi cấy phân lập thực khuẩn thể tả bằng cách sử dụng các chủng chỉ thị là vi khuẩn tả O1 và O139, trong đó chủng tả Mak757 là chủng tả O1, type sinh học El tor, chủng tả H218 type sinh học cổ điển (Classic) và chủng AI4450 là chủng tả O139 Bengal. Kết quả nuôi cấy cho thấy 08 thực khuẩn thể (2,0%) được phân lập từ mẫu nước bề mặt và 02 thực khuẩn thể (0,5%) được phân lập từ mẫu môi gạc tôm. Cụ thể, có 01 chủng được phân lập bằng việc sử dụng chủng chỉ thị Mak757 (O1, El tor); 09 chủng thực khuẩn thể phân lập được bằng việc sử dụng chủng chỉ thị H218 (O1, cổ điển); không có thực khuẩn thể nào phân lập được bằng việc sử dụng chủng chỉ thị AI4450 (O139). Ngoài ra, kết quả phân tích cũng cho thấy 05 chủng thực khuẩn thể tả phân lập được tại Hải Phòng, 05 chủng thực khuẩn thể tả phân lập được tại Thái Bình; không có thực khuẩn thể nào phân lập được tại Hà Nội và Nam Định. Số thực khuẩn thể phân lập được từ các mẫu nước bề mặt và môi gạc tôm từ kênh mương chiếm nhiều nhất với 09 thực khuẩn thể, 01 thực khuẩn thể được phân lập từ mẫu nước sông, không có thực khuẩn thể nào được phân lập từ địa điểm ao/hồ. Như vậy, tất cả các mẫu nghiên cứu nuôi cấy đều không phân lập được thực khuẩn thể tả bằng sử dụng chủng chỉ thị AI4450 (O139) tại địa điểm ao/hồ. Kết quả nghiên cứu năm 2014 của Al-Fendi A. và cộng sự cũng cho thấy kết quả tương tự khi phân lập được 03 thể thực khuẩn tả tan họ Myoviridae từ các nguồn nước khác nhau (hồ, ao, sông, mương và nước thải) ở Kelantan, Malaysia; các thực khuẩn thể tả phân lập được ở nghiên cứu này có phạm vi vật chủ hẹp và chỉ có khả năng lây nhiễm đối với vi khuẩn tả O1 El tor Inaba [23].

Mặc dù nuôi cấy phân lập chỉ phát hiện ra thực khuẩn thể tả ở 02/04 điểm nghiên cứu, nhưng phương pháp PCR lại phát hiện ra thực khuẩn thể tả ở 04/04 điểm nghiên cứu. Kết quả xét nghiệm bằng phương pháp PCR cho thấy gen *fs2*

(gen đặc hiệu cho thực khuẩn thể tả dạng sợi *fs2*) với số mẫu phát hiện thực khuẩn thể lần lượt là 42 mẫu (10,5%) và 67 mẫu (16,75%). Tiếp theo là gen *fs1* (gen đặc hiệu cho thực khuẩn thể tả dạng sợi *fs1*) với số mẫu phát hiện thực khuẩn thể lần lượt là 20 mẫu (5,0%) và 57 mẫu (14,25%). Không phát hiện gen vi khuẩn tả O1 và O139 trong mẫu nước bề mặt, không tìm thấy các gen vi khuẩn tả O1 và gen độc tố tả *ctxA* trong mẫu môi gạc tôm.

Việc phát hiện thực khuẩn thể tả ở cả 04 điểm nghiên cứu là phù hợp với sự lưu hành và dịch bệnh tả tại các địa điểm nghiên cứu. Theo các báo cáo trước đây, Hải Phòng là nơi đầu tiên tại miền Bắc lây dịch tả từ Hồng Kông năm 1937-1938, tiếp đó là những vụ dịch rải rác từ sau 1975 trở lại đây. Trong giai đoạn từ năm 2000 đến năm 2007, Hải Phòng là nơi xuất hiện dịch nhiều nhất, tiếp đó là Hà Nội, Thái Bình và Nam Định [2]; vụ dịch năm 2007 tại Hà Nội kéo dài đến sang năm 2008 [111]. Năm 2010, tỷ lệ mắc tả/100.000 dân tại Hà Nội là 3,53, Hải Phòng là 0,8 và Nam Định là 1,4 [4]. Kết quả này của chúng tôi cũng tương đồng với kết luận rằng các thực khuẩn thể tả có thể ảnh hưởng đến tính thời vụ của bệnh tả và cũng có thể đóng vai trò trong việc xuất hiện các nhóm huyết thanh hoặc chủng vi khuẩn tả gây dịch mới trong nghiên cứu của S. M. Faruque và cộng sự năm 2005 tại Dhaka, Bangladesh [60]. Do vậy, việc phát hiện thực khuẩn thể tả ở địa điểm xuất hiện trường hợp tả trong nghiên cứu này là phù hợp.

Mặc dù kết quả nuôi cấy thực khuẩn thể tả theo thời gian cho thấy phát hiện thực khuẩn thể tả tại các tháng 2, tháng 4, tháng 6, tháng 8, tháng 10 năm 2018 và tháng 8 năm 2019. Tháng 12 năm 2018 và các tháng 2, tháng 4, tháng 6 năm 2019 không phát hiện thấy thực khuẩn thể tả tại tất cả các địa điểm nghiên cứu. Không phát hiện thực khuẩn thể tả tại Nam Định và Hà Nội trong toàn bộ thời gian nghiên cứu từ tháng 2 năm 2018 đến tháng 8 năm 2019. Tuy nhiên kết quả PCR lại cho thấy, tháng nào trong năm cũng phát hiện ra thực

khuẩn thể tả, tập trung phát hiện nhiều vào tháng 4 và tháng 6 trong năm. Điều này cũng phù hợp với đặc điểm của bệnh tả có thể xuất hiện ở các tháng trong năm [4].

Kết quả nuôi cấy cho thấy thực khuẩn thể tả phân lập được chủ yếu ở Hải Phòng và Thái Bình với các mẫu nước bề mặt kênh/mương. Cũng như kết quả PCR tập trung nhiều ở 03/04 tỉnh ven biển là Hải Phòng, Thái Bình và Nam Định. Điều này phù hợp với đặc điểm tự nhiên của hai tỉnh/thành phố Hải Phòng và Thái Bình hay Nam Định, đây là tỉnh/thành phố có vùng cửa sông ven biển nhiều nước mặn và nước lợ, đặc biệt tại Hải Phòng và Thái Bình có hệ thống kênh/mương dài và ngoằn ngoèo phục vụ chủ yếu cho tưới tiêu cây trồng và sinh hoạt. Các báo cáo trước đây về môi trường cũng chỉ ra rằng vi khuẩn tả tồn tại chủ yếu ở nước bề mặt, đặc biệt là vùng nước lợ [7].

Do đó việc tìm thấy thực khuẩn thể tả thường xuyên theo tháng tại các địa bàn dịch tễ của bệnh tả là phù hợp với thực tế do thực khuẩn thể tả được biết có mối tương quan và ảnh hưởng đến sự hiện diện của phẩy khuẩn tả trong môi trường [60].

Về phương pháp xét nghiệm, kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng phương pháp PCR có giá trị hơn khi phát hiện thực khuẩn thể tả gấp 23,9 lần (95%CI:12,6-51,1) so với phương pháp phân lập. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó vì phương pháp nuôi cấy thông thường có tỷ lệ phát hiện căn nguyên thấp và chỉ phân lập được một số vi khuẩn [120] trong khi đó phương pháp PCR được đánh giá là một phương pháp đơn giản và mạnh mẽ để xác minh sự hiện diện của các thực khuẩn thể nhanh hơn so với xét nghiệm mảng bám, dựa trên việc phát hiện axit nucleic [22]. Tuy nhiên, phương pháp PCR có thể áp dụng đối với việc phát hiện thực khuẩn thể dạng sợi *fs1*, *fs2*; còn phương pháp nuôi cấy áp dụng cho việc phát hiện các thực khuẩn thể khác do phương pháp PCR chưa áp dụng để phát hiện các thực khuẩn thể này.

Theo nghiên cứu của D. R. Nalin và cộng sự (1979) [104], chất chitin là chất thu hút và bảo vệ vi khuẩn tả dưới các điều kiện của môi trường (nhiệt độ, pH, độ mặn ...) do đó việc lấy mẫu môi gạc tôm (vỏ tôm có chứa chất chitin) để ưu tiên cho việc xét nghiệm phát hiện vi khuẩn tả; ngoài ra, mẫu môi gạc tôm được lưu giữ qua đêm có khả năng làm tăng việc tiếp xúc giữa vi khuẩn tả và mẫu môi; đối với mẫu nước bề mặt sẽ được ưu tiên trong việc xét nghiệm phát hiện thực khuẩn thể tả. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy kết quả của phương pháp xét nghiệm phát hiện thực khuẩn thể tả bằng phương pháp phân lập với mẫu nước bề mặt có tỷ lệ phát hiện thực khuẩn thể tả nhiều hơn mẫu môi gạc tôm (không có ý nghĩa thống kê); do mẫu nước bề mặt ưu thế trong xét nghiệm phát hiện thực khuẩn thể tả còn mẫu môi gạc tôm ưu thế trong xét nghiệm vi khuẩn tả. Tại phương pháp PCR, tỷ lệ phát hiện thực khuẩn thể tả của loại mẫu môi gạc tôm lại cao hơn mẫu nước bề mặt (có ý nghĩa thống kê), điều này hợp lý vì thực khuẩn thể dạng sợi *fs1*, *fs2* thường cư trú và nhân lên song hành cùng tế bào vi khuẩn tả; cho nên, do mẫu môi gạc tôm có ưu thế trong việc phát hiện vi khuẩn tả dẫn đến tăng khả năng phát hiện thực khuẩn thể dạng sợi *fs1*, *fs2* thông qua phương pháp PCR. Thực khuẩn thể tả dạng sợi (*fs1*, *fs2*) không phải là thực khuẩn thể tả tan và có phổ vật chủ rộng hơn bao gồm cả vi khuẩn tả O1, O139 và nhóm NAG nên có thể không phát hiện sự có mặt của vi khuẩn tả nhưng vẫn phát hiện thấy sự có mặt của thực khuẩn thể tả dạng sợi. Tuy vậy, thực khuẩn thể dạng sợi có liên quan đến các chủng gây dịch. Người ta tìm thấy thực khuẩn thể dạng sợi ở những mẫu phân bệnh nhân tả nhưng các chủng tả lưu giữ trong phòng thí nghiệm một thời gian thì thực khuẩn thể này biến mất. Do vậy, đã có giả thuyết chủng tả trong tự nhiên muốn gây dịch thì cần có gen độc tố tả và có phơi nhiễm với thực khuẩn thể tả dạng sợi. Khoảng thời gian tiến hành nghiên cứu (2018-2019), tại các địa điểm nghiên cứu không xuất hiện dịch tả nhưng đây là những vùng đã xuất hiện dịch

tả trong những năm trước. Việc phát hiện ra thực khuẩn thể tả trong thời gian không xuất hiện dịch tại nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu của Solis-Sanchez, A. và cộng sự (2016) tại Mexico [136].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khẳng định có sự tồn tại của thực khuẩn thể tả tại các địa điểm nghiên cứu, cụ thể: bằng phương pháp nuôi cấy, nghiên cứu đã phát hiện được sự lưu hành của thực khuẩn thể tả tại Thái Bình và Hải Phòng (10 thực khuẩn thể tả); vị trí phát hiện chủ yếu là tại kênh/mương (09/10 thực khuẩn thể tả) và sông (01/10 thực khuẩn thể tả); bằng phương pháp PCR, thực khuẩn thể tả dạng sợi (*fs1*, *fs2*) được phát hiện ở tất cả các địa điểm nghiên cứu và ở tất cả các tháng trong năm, đặc biệt là ở các tỉnh/thành phố ven biển như Hải Phòng, Thái Bình, Nam Định.

Từ năm 1854, John Snow đã khẳng định nước là yếu tố lây truyền bệnh chủ yếu trong dịch tễ học bệnh tả. Các chất thải, dịch tiết đường tiêu hóa của người bệnh tả thải ra môi trường nước là nguồn lây chủ yếu. Thói quen sử dụng nước không vệ sinh và không được khử trùng đóng vai trò chủ yếu trong lan truyền bệnh tả [6]. Đồng thời, việc phát hiện sự tồn tại của thực khuẩn thể tả, trong đó có thực khuẩn thể tả dạng sợi (*fs1*, *fs2*) trong môi trường nước ngoại cảnh tại các địa điểm xuất hiện dịch tả trước đây có ý nghĩa quan trọng trong việc cảnh báo nguy cơ bùng phát dịch tả [6], [60]. Do vậy, việc tổ chức giám sát sự lưu hành của thực khuẩn thể tả định kỳ hoặc đột xuất có ý nghĩa quan trọng giúp các nhà chuyên môn có những biện pháp xử lý kịp thời theo quy định để phòng, chống dịch tả có hiệu quả.

4.2. Khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả trong các điều kiện mật độ, pH, và nhiệt độ khác nhau

4.2.1. Trong phòng thí nghiệm

Nghiên cứu của Nguyen và cộng sự (2001), Endersen và cộng sự (2001), Yoichi và cộng sự (2005) báo cáo về tính đặc hiệu của phạm vi vật chủ đối với

thực khuẩn thể phân lớn liên quan đến các protein ở sợi đuôi của nó; điều đó cho phép vi rút nhận biết và liên kết với các vị trí thụ thể cụ thể trên bề mặt tế bào vật chủ [57], [110], [158].

Scholl và cộng sự (2001) báo cáo trường hợp một thể thực khuẩn mã hóa hai loại protein sợi đuôi khác nhau và có thể cho phép nó lây nhiễm và nhân lên trên hai chủng vi khuẩn khác nhau [125]. Nghiên cứu của Lu Gao và cộng sự (2022) cho thấy rằng chủng thực khuẩn thể tả OY1 có khả năng ly giải với 04 loại vi khuẩn tả khác nhau [67]. Theo Hyman (2019), hoạt động ly giải mạnh cùng với phạm vi vật chủ rộng, khả năng chịu pH rộng là những đặc điểm quan trọng để có thể đề xuất, tuyển chọn thực khuẩn thể tả trong việc sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học [74].

Thử nghiệm nhạy cảm của thực khuẩn thể tả với các chủng vi khuẩn tả

Để tìm kiếm thực khuẩn thể tả để sử dụng trong liệu pháp phage, thực khuẩn thể có phạm vi vật chủ rộng hơn sẽ tốt hơn những loại có phạm vi vật chủ hẹp vì chúng có thể ức chế một số chủng vi khuẩn gây bệnh [102]. Nghiên cứu của Hyman (2019) đã xác định được một số thực khuẩn thể có phạm vi vật chủ rộng có thể lây nhiễm với nhiều nhóm chủng vi khuẩn thử nghiệm, một số thực khuẩn thể có phạm vi vật chủ hẹp chỉ khu trú trong một đến 02 nhóm vi khuẩn tả thử nghiệm. Đặc điểm này của thực khuẩn thể làm cho nó hữu ích để sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với thực khuẩn thể khác để kiểm soát vi khuẩn tả trong môi trường ngoại cảnh hoặc trong điều trị bệnh nhân tiêu chảy do vi khuẩn tả [74].

Đặc tính cảm nhiễm/ly giải có ý nghĩa rất quan trọng trong liệu pháp thực khuẩn thể. Hầu hết các thực khuẩn thể đã biết chỉ tương tác với một nhóm vi khuẩn cụ thể, và có các ràng buộc cụ thể. Phạm vi vật chủ hẹp này cũng là một thách thức đáng kể đối với liệu pháp thực khuẩn thể. Do đó, không có thực khuẩn thể tả nào có thể cảm nhiễm/ly giải tất cả các chủng vi khuẩn tả. Tính

đặc hiệu cao này với các vật chủ của thực khuẩn thể tả dẫn đến việc cần có thực khuẩn thể để ức chế vi khuẩn tả mới phân lập. Thực khuẩn thể thường được phân lập từ môi trường mà ở đó có sự tồn tại của vi khuẩn ký chủ tương ứng [102]. Vì vậy sử dụng các chủng vi khuẩn tả phân lập được từ các địa điểm đã xảy ra dịch tả trong thời gian trước là lý tưởng để phân lập các thực khuẩn thể tả ở môi trường nước ngoài cảnh.

Kết quả đánh giá khả năng ly giải của các chủng thực khuẩn thể với các chủng vi khuẩn tả phân lập được từ các vụ dịch tả trên thế giới và Việt Nam tại bảng 3.12 cho thấy chủng vi khuẩn tả O1 cổ điển có số thực khuẩn thể tả cảm nhiễm/ly giải cao hơn so với các chủng vi khuẩn tả El tor, O139 và chủng tả phân lập được tại Việt Nam giai đoạn 1995-2010. Chủng vi khuẩn tả cổ điển O1, H218 có số cảm nhiễm/ly giải cao nhất với 31/36 chủng thực khuẩn thể tả chiếm 86,11%, tiếp đến là chủng tả cổ điển O1 Bgd17 có số cảm nhiễm/ly giải là 24/ 36 chiếm 66,67%. Chủng vi khuẩn tả phân lập được trong các vụ dịch tả tại Việt Nam năm 2007 có số cảm nhiễm/ly giải 11/36 chiếm 30,56%. Đây cũng là chủng có số cảm nhiễm/ly giải cao hơn so với các chủng vi khuẩn tả phân lập được trong các vụ dịch tả tại Việt Nam năm 1995, 2003 và 2010. Chủng vi khuẩn tả O139 AI4450 có chỉ số cảm nhiễm thấp nhất, không thực khuẩn thể nào trong tổng số 36 chủng thực khuẩn thể tả trong nghiên cứu cảm nhiễm/ ly giải chủng vi khuẩn tả O139 AI4450.

Các chủng thực khuẩn thể tả phân lập được tại Việt Nam có khả năng cảm nhiễm/ly giải từ 38-41% các chủng vi khuẩn tả O1 El tor phân lập được từ các vụ dịch tả tại Ấn Độ, Nhật Bản, Bangladesh, đối với các chủng vi khuẩn tả phân lập được tại Việt Nam thì các chủng thực khuẩn thể tả có khả năng cảm nhiễm/ly giải từ 19% đến 33%. Như vậy các chủng vi khuẩn tả cổ điển vẫn là các chủng vi khuẩn có ưu thế hơn trong việc lựa chọn là chủng chỉ thị trong việc phân lập thực khuẩn thể tả.

Thực khuẩn thể VP14 và VP28 là 02 chủng thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải cả 04 nhóm chủng vi khuẩn tả cổ điển, El tor, Bengal và chủng tả phân lập trong các vụ dịch tả tại Việt Nam trong đó chủng VP14 có khả năng ly giải 11/13 chủng vi khuẩn tham gia thử nghiệm bao gồm 02/03 chủng vi khuẩn tả O1 cổ điển, 03/ 03 chủng vi khuẩn tả O1 El tor, 02/03 chủng vi khuẩn tả O139 Bengal, và 04/04 chủng vi khuẩn tả thu thập trong 04 vụ dịch tả tại Việt Nam các năm 1995, 2003, 2007 và 2010. Đây là 02 chủng thực khuẩn thể có tiềm năng lớn trong việc lựa chọn để sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ trong điều trị bệnh nhân tả và xử lý các khu vực có ô nhiễm vi khuẩn tả.

Thực khuẩn thể VP04 là có khả năng ly giải các nhóm chủng vi khuẩn tả Cổ điển, El tor và nhóm chủng tả phân lập trong các vụ dịch tả tại Việt Nam. Mặc dù không ly giải với nhóm chủng tả O139 Bengal (chủng vi khuẩn tả này chưa phát hiện và gây dịch tại Việt Nam) nhưng chủng thực khuẩn thể VP04 cùng với chủng VP14 là 2 chủng duy nhất trong tổng số 36 chủng thực khuẩn thể thử nghiệm có khả năng ly giải với 4/4 chủng thực vi khuẩn tả phân lập từ các vụ dịch tả trong các năm 1995, 2003, 2007 và 2010 tại Việt Nam được đưa vào nghiên cứu này. Đây cũng là mẫu chủng lý tưởng trong việc tuyển chọn sử dụng cho mục đích kiểm soát các dịch tả tại Việt Nam [102].

Thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả với các loại vi khuẩn gây tiêu chảy đường ruột khác nhau.

Sự hiểu biết của chúng ta về phạm vi vật chủ của thể thực khuẩn vẫn còn rất hạn chế. Có bằng chứng rõ ràng rằng, không phải tất cả vi khuẩn đều bị nhiễm bởi tất cả các thể thực khuẩn, và thực tế là hầu hết các thể thực khuẩn chỉ có thể lây nhiễm một phân lớp dưới của loài vi khuẩn [65]. Frisch A.W. và cộng sự (1936) đã nghiên cứu về tính đặc hiệu của thực khuẩn thể và cho đến hiện nay chưa có báo cáo về việc thực khuẩn thể có khả năng ly giải với loài vi khuẩn khác không đặc hiệu với chúng [66].

Trong nghiên cứu này, để xác định tính đặc hiệu với vật chủ, chúng tôi tiến hành thử nghiệm khả năng ly giải của 36 chủng thực khuẩn thể phân lập được từ mẫu nước tại các tỉnh Hải Phòng và Thái Bình với các chủng vi khuẩn gây bệnh đường ruột, kết quả cho thấy các chủng thực khuẩn thể thử nghiệm không ly giải các chủng vi khuẩn khác loài vi khuẩn tả bao gồm vi khuẩn *V. cholerae*, Tụ cầu vàng (*S. aureus*) và 03 chủng vi khuẩn đường ruột (*E. coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*).

Kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu khác về sự đặc hiệu của thực khuẩn thể chỉ cảm nhiễm/ly giải cho một loài vi khuẩn duy nhất và thường chỉ đặc hiệu cho một số chủng trong loài đó [31], [122], [157].

Thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả với các điều kiện mật độ, pH và nhiệt độ môi trường khác nhau

Về mật độ thực khuẩn thể, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải với độ pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-6} , trong khi với độ pha loãng từ 10^{-7} đến 10^{-10} thực khuẩn thể tả không có khả năng ly giải. Kết quả trên chỉ ra rằng, ở những độ pha loãng cao nhất, thực khuẩn thể tả không thực hiện được quá trình ly giải. Điều này có thể giải thích do khả năng ly giải của thực khuẩn thể phụ thuộc vào một ngưỡng mật độ nhất định của thể thực khuẩn mới có khả năng ly giải vi khuẩn tả. Kết quả này cũng được Mark A Jensen và cộng sự (2006) khẳng định rằng: nếu có quá ít thể thực khuẩn (10^{-7} thực khuẩn thể trong một lít hoặc ít hơn) thì hầu như không có khả năng ly giải vi khuẩn tả [78].

Về pH môi trường, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xem xét sự ổn định thực khuẩn thể và khả năng ly giải vi khuẩn tả trong một số dải pH môi trường nước khác nhau. Có thể do pH của môi trường ảnh hưởng đến sự tồn tại của thực khuẩn thể qua đó tác động đến mức độ ly giải của thực khuẩn thể với các vi khuẩn tả. Liên quan đến ứng dụng xử lý vi khuẩn tả trong môi trường

nước ngoài cảnh, Jaiswal A (2014) và Ackermann HW (2006) đã tiến hành nghiên cứu sự tồn tại của các thực khuẩn thể trong môi trường có tính a xít và thấy rằng pH là yếu tố quan trọng cho sự tồn tại này [20], [76]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, 100% thực khuẩn thể có khả năng ly giải ở điều kiện môi trường có pH 4,0 đến pH 10,0. Nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của Lu Gao và cộng sự (2022), trong đó khả năng ly giải của thực khuẩn thể cao nhất trong dải pH từ 5,0 đến 9,0 và giảm khả năng ly giải ở pH 4,0 và pH 10,0 [67].

Về nhiệt độ, nghiên cứu của Ackermann HW và cộng sự (2006) cho thấy, nhiệt độ đóng vai trò cơ bản trong việc gắn kết, thâm nhập, nhân lên, tồn tại và lưu trữ các thực khuẩn thể [20]. Thực khuẩn thể có thể tồn tại ở nhiệt độ cao (40°C – 90°C) và cũng có thể được tìm thấy ở các môi trường khác ngoài môi trường sống có nhiệt độ khắc nghiệt [155]. Nhiệt độ là một trong những yếu tố môi trường quan trọng nhất, ảnh hưởng mạnh mẽ đến nhiều các khía cạnh của hệ thống sinh học. Một trong những đặc điểm quan trọng của nhiệt độ, yếu tố môi trường, là sự biến động của nó trên một nhiều loại quy mô không gian và thời gian làm cho có thể cũng như hạn chế sự tồn tại của cuộc sống trong các góc ngách khác nhau. Ảnh hưởng của nhiệt độ dựa trên hệ thống sinh học rất đa dạng và người ta đã quan sát thấy rằng sự tiến hóa của các đặc điểm kiểu hình, sự phân bố loài và sự tuyệt chủng trong nhiều trường hợp có thể bắt nguồn từ những thay đổi trong các chế độ nhiệt độ khác nhau [148]. Dựa vào bảng kết quả thử nghiệm cho thấy, khả năng ly giải của thực khuẩn thể phụ thuộc rất nhiều vào nhiệt độ môi trường. Thực khuẩn thể tả không thể phát triển và thực hiện ly giải các vi khuẩn tả ở điều kiện nhiệt độ môi trường 4°C , trong khi ở 15°C , 25°C và 30°C , hoạt động ly giải đã được thực hiện nhưng hơi chậm trễ (Bảng 3.16).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, với nhiệt độ 4°C, và 45°C, 55°C thực khuẩn thể tả có thể bị bất hoạt và không có khả năng ly giải; nhiệt độ 15°C, thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải nhưng còn hạn chế và với nhiệt độ 25°C, 41°C, thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải tốt hơn khoảng nhiệt độ 15°C. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của M.K.Taj và cộng sự (2014); tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi đã đánh giá sâu hơn về mức độ ly giải của thực khuẩn thể tả tại các mốc nhiệt độ khác nhau như kết quả nêu trên [142]. Sự gia tăng nhiệt độ ở mức trên 45°C làm giảm sự tồn tại của thực khuẩn thể và hoạt động của chúng, kết quả đó phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi cũng như nghiên cứu của Basdew và Laing (2014) [30].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy, khoảng nhiệt độ từ 30°C đến 37°C là tốt nhất cho khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả tương tự như nghiên cứu của M.K.Taj và cộng sự (2014); hay như Pope và cộng sự (2004) cũng chỉ ra rằng sự gia tăng khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả tại khoảng nhiệt độ từ 30°C và 39°C, nhiệt độ môi trường 37°C là nhiệt độ lý tưởng cho hoạt động ly giải của thực khuẩn thể với các chủng vi khuẩn chỉ thị [82].

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả cũng được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây. Nghiên cứu của Groman (1962) nhận thấy rằng, nhiệt độ thấp hơn 37°C làm giảm khả năng ly giải của thực khuẩn thể; nhiệt độ 41°C là phù hợp cho sự phát triển và ly giải của thực khuẩn thể trên vi khuẩn vật chủ [70]. Nghiên cứu của Pollard và Woodyatt (1964) cũng báo cáo thực khuẩn thể ly giải tốt ở 41°C, trong khi ở điều kiện nhiệt độ 45°C và 55°C là yếu tố hạn chế và gây ra sự bất hoạt thực sự của thực khuẩn thể [118].

4.2.2. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả ở nguồn nước ngoài cảnh cộng đồng

Thời gian tồn tại và khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoài cảnh cộng đồng

Về thời gian tồn tại, trong nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra rằng đối với nước máy và nước mưa, tại thời điểm 01 tháng phát hiện thực khuẩn thể tả có khả năng tồn tại đến 01 tháng, thực khuẩn thể tả giảm nhiều sau 02 tuần thử nghiệm. Ở các mốc thời gian 03 tháng và 06 tháng thì không phát hiện thấy sự tồn tại của thực khuẩn thể tả. Đây là loại nước mà người dân thường sử dụng trong ăn uống hàng ngày. Cũng trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy nguồn nước sông/suối; nước ao/hồ là nước bề mặt và là nguồn nước mà người dân thường sử dụng trong sinh hoạt hàng ngày thì thực khuẩn thể tả có khả năng tồn tại đến 03 tháng, thực khuẩn thể tả giảm nhiều sau 01 tháng thử nghiệm. Ở mốc thời gian 06 tháng thì không phát hiện thấy sự tồn tại của thực khuẩn thể tả. Đối với nước giếng, thực khuẩn thể tả có khả năng tồn tại tương tự như nước sông/suối, nước ao/hồ; đây là nguồn nước ngầm cũng thường được người dân sử dụng trong sinh hoạt hàng ngày. Qua kết quả này, có thể nhận thấy đối với các nguồn nước dễ bị ô nhiễm bởi các yếu tố môi trường và con người (nước sông/suối; nước ao/hồ; nước giếng) thì thực khuẩn thể có thời gian tồn tại dài hơn so với các nguồn nước ít có sự tác động với các yếu tố nêu trên như nước máy, nước mưa dùng trong ăn uống hàng ngày.

Về khả năng ly giải, trong nghiên cứu của chúng tôi đối với nguồn nước máy và nước mưa, thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải đến 02 tuần, thực khuẩn thể tả giảm khả năng ly giải nhiều sau 01 tuần thử nghiệm. Ở các mốc thời gian 01 tháng, 03 tháng và 06 tháng thì không xác định được đặc tính ly giải của thực khuẩn thể tả. Đối với nguồn nước sông/suối, nước ao/hồ, nước giếng thì thực khuẩn thể tả có khả năng ly giải đến 01 tháng, thực khuẩn thể tả

giảm khả năng ly giải nhiều sau 02 tuần thử nghiệm. Ở các mốc thời gian 03 tháng và 06 tháng thì không xác định được đặc tính ly giải của thực khuẩn thể tả. Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả phụ thuộc vào mật độ thực khuẩn thể tồn tại trong môi trường nước và mật độ này giảm theo thời gian như kết quả tại Bảng 3.17; điều này lý giải tại các mốc thời gian từ 01 tháng trở đi không được xác định được sự ly giải của thực khuẩn thể tả VP04 mặc dù thực khuẩn thể tả vẫn tồn tại đến 03 tháng hoặc 06 tháng tùy từng nguồn nước.

Khả năng tồn tại của thực khuẩn thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố lý hóa (pH, ion, nhiệt độ...;) trong điều kiện môi trường. Sự tồn tại của các thực khuẩn thể phụ thuộc vào các yếu tố bên ngoài [82].

pH môi trường là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự tồn tại của thực khuẩn thể. Thực khuẩn thể của *S. aureus* đã giảm 2 log trong khoảng thời gian từ 4 đến 6 giờ khi pH giảm từ 6,19 xuống 5,38 [68]. Sự phát triển của một số thực khuẩn thể bị hạn chế khi pH thấp hơn 4,5. Ví dụ, thực khuẩn thể T4 (họ Myoviridae) không ổn định ở pH < 5. Thực khuẩn thể PM2 (họ Corticoviridae) mất hoàn toàn hoạt động sau 01 giờ ở pH 5,0 và 37°C. pH có thể có tác động tiêu cực đến sự sống sót của các thực khuẩn thể, điều này có thể dẫn đến thất bại của liệu pháp phage trong điều trị người bệnh [152].

Một số thực khuẩn thể có thể được bảo quản trong thời gian dài với pH trung tính (6,0 đến 8,0) ở dạng dung dịch hoặc đông khô [82]. Trong bảng kết quả 3.17 và biểu đồ 3.8, pH của môi trường nước dao động từ 6,8 đến 8,1. Các mẫu nước sông/suối, mẫu nước ao/hồ và nước giếng có pH cao hơn các mẫu nước mưa, nước máy. Đây là dải pH thích hợp với sự tồn tại lâu dài của các thực thể [82]. Tuy vậy theo kết quả thử nghiệm về thời gian tồn tại của thực khuẩn thể tả VP04 tại Bảng 3.17 thì thực khuẩn thể tả tại các mẫu nước sông/suối, ao/hồ và nước giếng có thời gian tồn tại lâu hơn thực khuẩn thể thử nghiệm tại các mẫu nước mưa và nước máy từ 01 đến 03 tháng. Điều này cho

thấy pH trong mẫu nước ngoại cảnh có thể liên quan đến thời gian tồn tại của các thực khuẩn thể tả.

Theo nghiên cứu của Hurst và cộng sự (1980), Yates và cộng sự (1985), Nasser và Oman (1999), Olson và cộng sự (2004); nhiệt độ là một yếu tố quan trọng đối với khả năng sống sót của thể thực khuẩn [73], [106]; [112], [156], nhiệt độ đóng vai trò cơ bản trong việc gắn, xâm nhập, nhân lên và kéo dài thời gian tiềm ẩn (trong trường hợp các thể thực khuẩn lysogen). Ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ tối ưu, ít vật liệu di truyền của thực khuẩn thể xâm nhập vào tế bào chủ của vi khuẩn hơn; do đó, thực khuẩn thể sẽ ít có thể tham gia vào giai đoạn nhân lên. Theo Tey và cộng sự (2009), nhiệt độ cao hơn có thể kéo dài thời gian của giai đoạn tiềm ẩn [144]. Hơn nữa, nhiệt độ xác định sự xuất hiện, khả năng tồn tại và lưu trữ của thực khuẩn thể.

Các môi trường không điển hình mà thực khuẩn thể có thể tồn tại là suối nước nóng (đạt nhiệt độ 40–90°C). Nghiên cứu của Breitbart và cộng sự (2004) nhận thấy thực khuẩn thể được phân lập từ những con suối như vậy ở California đã được thử nghiệm ở nhiệt độ thấp và cao [36]. Người ta quan sát thấy rằng hơn 75% các thực khuẩn thể vẫn còn nguyên vẹn ngay cả khi được ủ trên băng (khoảng 0°C). Chúng nhạy cảm hơn khi đun sôi ở 105°C, vì chỉ 18–30% thực khuẩn thể còn nguyên vẹn (Mocé-Llivina và cộng sự 2003) [97]. Họ đã kiểm tra khả năng chịu nhiệt của coliphages soma, thực khuẩn thể lây nhiễm *B. fragilis* và phage RNA đặc hiệu - F. Trong cả hai trường hợp, họ quan sát thấy rằng các thực khuẩn thể có khả năng chống xử lý nhiệt tốt hơn vi khuẩn. Hơn nữa, các thực khuẩn thể đặc hiệu - F có khả năng chịu nhiệt kém hơn so với các thực khuẩn thể trong các thử nghiệm khác, được ủ cả trong bùn và nước thải. Mức độ giảm hiệu giá của coliphages soma xảy ra tự nhiên trong bùn sau khi xử lý nhiệt ở 60°C là 1,0 log sau 60 phút và ở 80°C là 2,5 log. Caldeira và Peabody (2007) đã nghiên cứu vai trò của các liên kết chéo disulfide trong việc

bảo vệ các thể thực khuẩn chống lại sự biến tính nhiệt. Họ đã thử nghiệm thực khuẩn thể *Pseudomonas* RNA PP7 có khả năng chịu nhiệt cao và quan sát thấy rằng các hạt của nó, chỉ bắt đầu biến tính sau khi đun nóng trong 02 phút ở 90°C, đã mất tính ổn định sau khi thêm 1,4 - dithiothreitol, một chất khử phá hủy các liên kết disulfide giữa phũ các chất làm mờ protein bằng cách liên kết ngang với một capsid icosahedral của thực khuẩn thể [40]

Khả năng chịu nhiệt cao là đặc trưng cho cả vi khuẩn môi trường và vi khuẩn *Lactococcal*. Buzrul và cộng sự (2007) đã tiếp xúc với 10 thực khuẩn thể của *Lactococcus spp.* lơ lửng trong canh thang ở 72°C (15 phút) và 90°C (05 phút). Ở nhiệt độ thấp hơn, chỉ có hai thực khuẩn thể bị bất hoạt, nhưng việc tiếp xúc ở 90°C đã làm bất hoạt một nửa số thực khuẩn thể được khảo sát [38]. Atamer và cộng sự (2008) cho thấy $\approx 40\%$ thực khuẩn thể *Lactococcus lactis* được phân lập từ các công ty sữa khác nhau của Đức sống sót khi đun nóng ở 80°C trong 05 phút khi lơ lửng trong sữa. Nhưng hầu như tất cả các thực khuẩn thể đều bị bất hoạt hoàn toàn khi nhiệt độ tăng lên 95°C. Hai thực khuẩn thể P680 và P1532 được chứng minh là có khả năng chịu nhiệt độ cao vượt trội; thực khuẩn thể P680 sống sót sau 05 phút bất hoạt nhiệt ở 95°C. Có thể phát hiện thực khuẩn thể P1532 ngay cả sau khi ủ ở 97°C trong cùng khoảng thời gian. Sữa bảo vệ các thực khuẩn thể *Lactococcal* khỏi bị bất hoạt nhiệt tốt hơn các môi trường khác, chẳng hạn như nước dùng. Do đó, người ta đề xuất sử dụng sữa để đình chỉ các thực khuẩn thể trong các thí nghiệm điều tra ảnh hưởng của các yếu tố bất hoạt khác nhau đối với sự sống sót của thực khuẩn thể [27]. Whitman và Marshall (1971) đã phát hiện độ ổn định của các thực khuẩn thể ưa nhiệt độ thấp lây nhiễm *P. fragi*, được phân lập từ thực phẩm được làm lạnh, được xác định ở 60°C [154]. Sau 30 phút vô hiệu hóa các thực khuẩn thể *Pseudomonas ps1* và *wy*, tỷ lệ sống sót của thực khuẩn thể giảm trung bình lần lượt là trên 99% và 39%. Số lượng mảng bám giảm 15% và 72% sau khi

duy trì các thực khuẩn thể trong môi trường thạch mềm ở 45°C trong 02 và 10 phút tương ứng. Nghiên cứu đưa ra khuyến nghị để xác định chính xác hiệu giá thực khuẩn thể (không làm mất hoạt tính của thực khuẩn thể), bước này nên được thực hiện càng nhanh càng tốt.

Nhiệt độ bảo quản thực khuẩn thể là yếu tố quan trọng nhất quyết định hoạt tính của thực khuẩn thể. Thorne và Holt (1974), Mullan (2001) đã quan sát thấy các thực khuẩn thể như *B. cereus* CP-51 nhạy cảm với nhiệt độ thấp và tồn tại tốt hơn ở nhiệt độ phòng, nhưng việc bảo quản các thực khuẩn thể trong thời gian dài ở nhiệt độ môi trường thường không được khuyến nghị [100], [145]. Theo các tác giả, nhiệt độ tối ưu cho sự ổn định của thực khuẩn thể CP-51 là 15°C; họ đã chỉ ra rằng lysate nhân giống mới giữ lại 14% đơn vị hình thành mảng bám ban đầu (PFU) ở 0°C sau 07 giờ và chỉ 4% sau 24 giờ. Điều thú vị là môi trường chiết xuất men – canh thang dinh dưỡng (NBY) đã ổn định thực khuẩn thể trong điều kiện lạnh. Sau khi bổ sung NBY, thực khuẩn thể được pha loãng gấp 10 lần vẫn giữ được 36% hoạt tính sau 07 giờ và 19% sau 24 giờ ở 0°C. Khi các mẫu được bảo quản ở 15°C, không quan sát thấy hoạt tính giảm khi chúng được pha loãng gấp 10 lần trong NBY. Lysates duy trì hoạt động đầy đủ trong 02 tuần. Kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử, thực khuẩn thể CP-51 có đầu hình lục giác và đuôi co lại. Khi dung dịch thực khuẩn thể được bảo quản ở 0°C, nhiều đuôi của nó bị co lại. Khi chúng được bảo quản ở 15°C, người ta quan sát thấy đuôi dài ra thay vì co lại, nhưng đuôi bị co lại tăng lên trong vài tuần bảo quản.

Theo Ackermann và cộng sự (2004), các thực khuẩn thể có đuôi có khả năng chống bảo quản tốt nhất và cho thấy khả năng sống sót lâu nhất; một số trong số chúng vẫn có khả năng tồn tại ngay cả sau 10 đến 12 năm ở 4°C [21]. Loại thực khuẩn thể có đề kháng mạnh là T4, T5 và T7. Thể thực khuẩn *Shigella* C16 giống T4 giữ lại hiệu giá 10^3 sau 32 năm bảo quản trong cùng điều kiện.

Một số thể thực khuẩn, chẳng hạn như thể thực khuẩn chứa lipid, không ổn định sau khi bảo quản ở nhiệt độ 4°C nhưng có thể bảo quản ở -80°C hoặc trong nitơ lỏng. Jepson và March (2004) đã thử nghiệm ảnh hưởng của thời gian bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau đối với thể thực khuẩn λ [79]. Họ quan sát thấy rằng không có thể thực khuẩn nào tồn tại trong kho dự trữ thể thực khuẩn lỏng (đệm SM) ở 42°C sau 84 ngày; trong khi ở 37°C, không có thể thực khuẩn nào được phát hiện sau 120 ngày. Độ ổn định tốt của thực khuẩn thể đã được quan sát thấy khi chúng được bảo quản ở 4°C trong hơn 06 tháng. Trong nghiên cứu của Mullan (2001), *Lactococcus sp.* dung dịch thực khuẩn thể được bảo quản ở 02–05°C cho thấy hiệu giá thực khuẩn thể giảm không đáng kể khoảng 05–10% sau 06 tháng [100]. Tuy nhiên, phương pháp này được khuyến nghị để lưu trữ không quá 02 tháng. Mặc dù các thực khuẩn thể có khả năng chống đóng băng và tan băng, nhưng việc lặp lại các quy trình này quá thường xuyên trong khoảng thời gian ngắn có ảnh hưởng xấu đến sự ổn định của thực khuẩn thể. Tương tự, Olson và cộng sự (2004) khuyến nghị, 4°C là nhiệt độ tối ưu để lưu trữ thực khuẩn thể trong thời gian ngắn (không quá 40 ngày) trong nước thải [112]. Để bảo vệ các thực khuẩn thể khỏi bị bất hoạt trong thời gian dài hơn, chúng nên được duy trì ở -80°C. Họ quan sát thấy rằng 20% thực khuẩn thể MS2 bị bất hoạt sau 8 ngày bảo quản ở 4°C so với 57% ở -80°C. Điều thú vị là sau 290 ngày, ít thực khuẩn thể bị mất ở -80°C hơn ở 04°C (tương ứng là 75% và 93%). Bảo quản thực khuẩn thể ở -20°C không được khuyến nghị vì cấu trúc tinh thể của băng có thể gây ra sự phá hủy thực khuẩn thể, như Warren và Hatch (1969) đã chứng minh trước đây [151]. Theo Olson và cộng sự (2004), việc bổ sung 05–10% dung dịch glycerol vào huyền phù thể thực khuẩn có thể đảm bảo khả năng sống sót và khả năng lây nhiễm an toàn trong 30 ngày ở -20°C hoặc -70°C [112].

Trong nghiên cứu này, thời gian thử nghiệm từ tháng 3 năm 2020 đến tháng 9 năm 2020. Đây là khoảng thời gian của mùa Xuân và mùa Hạ, nhiệt độ môi trường dao động trong khoảng từ 20⁰C đến 40⁰C. Nhiệt độ này cũng là khoảng nhiệt độ thích hợp cho nhiều loại thực khuẩn thể duy trì và hoạt động ly giải. Trong bảng kết quả 3.17 và biểu đồ số 3.8, thực khuẩn thể VP04 có thời gian tồn tại trong mẫu nước máy và nước mưa thu thập tại các tỉnh/ thành phố Hà Nội, Hải Phòng, Thái Bình và Nam Định đến 01 tháng nhưng trong các mẫu nước ao/hồ; nước sông/suối và nước giếng, thực khuẩn thể VP04 có thời gian tồn tại đến 03 tháng. Kết quả này cho thấy, ở cùng một điều kiện nhiệt độ như nhau nhưng thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 ở các điều kiện nguồn nước khác nhau là khác nhau. Như vậy, có thể thấy khoảng nhiệt độ môi trường thử nghiệm mẫu từ 20⁰C đến 40⁰C không xác định thấy có sự ảnh hưởng hoặc ảnh hưởng không nhiều đến thời gian tồn tại của thực khuẩn thể VP04 trong các môi trường nước khác nhau thu thập từ các tỉnh/thành phố Hà Nội, Hải Phòng, Thái Bình và Nam Định.

4.3. Đề xuất một số biện pháp can thiệp để hạn chế sự bùng phát dịch tả

Bệnh tả là một bệnh lây qua đường nước (water-borne) tiếp tục gây ra gánh nặng bệnh tật cho các nước đang phát triển. Các cá nhân bị nhiễm bệnh do sử dụng nguồn nước bị ô nhiễm bởi các chủng vi khuẩn tả có độc lực. Các quan sát dịch tễ học và môi trường về một đợt bùng phát dịch tả ở Dhaka, Bangladesh, cho thấy rằng thực khuẩn thể tả đặc hiệu đối với vi khuẩn tả có thể hạn chế mức độ nghiêm trọng của các đợt bùng phát dịch tả bằng cách tiêu diệt vi khuẩn có trong ổ chứa và ở những người bị nhiễm bệnh [78]. Trên cơ sở đó, chúng tôi đề xuất một số biện pháp can thiệp để hạn chế sự bùng phát dịch tả dựa trên cơ sở lý luận như sau:

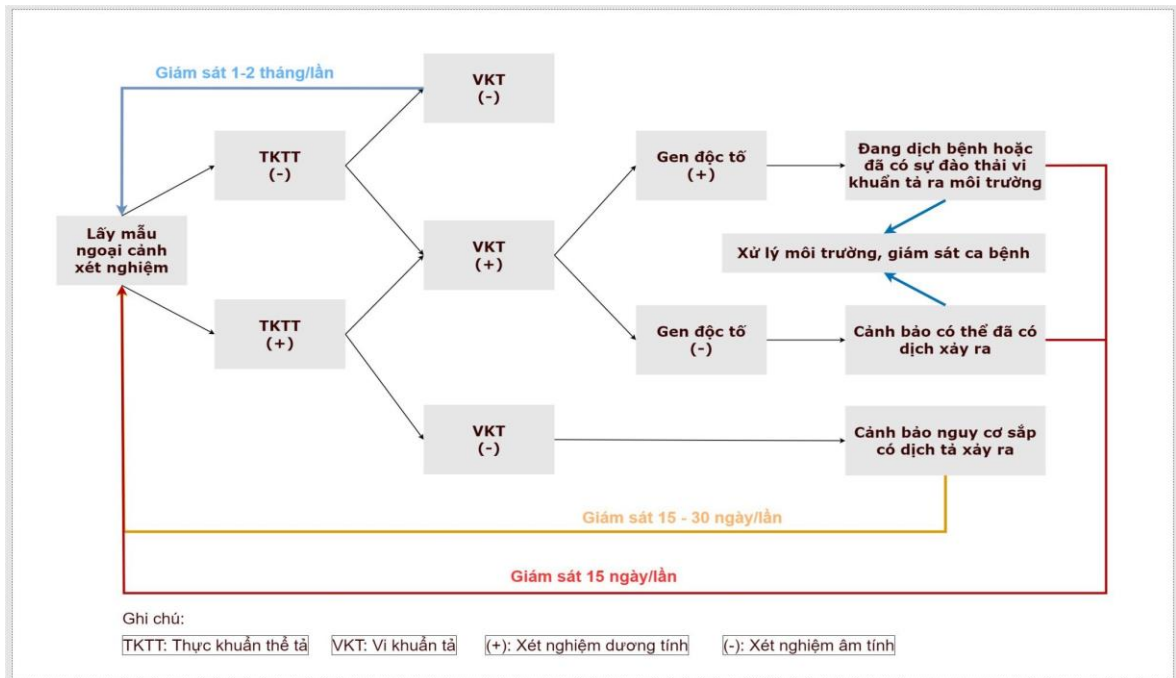
Thứ nhất, ở trạng thái cân bằng chưa bùng phát dịch, vì một số điều kiện môi trường nhất định nào đó, làm giảm sự cân bằng giữa thực khuẩn thể tả và

vi khuẩn tả, thể thực khuẩn tả mất đi khả năng làm hạn chế mật độ vi khuẩn tả trước khi bùng phát, kéo theo hậu quả là sự gia tăng mật độ vi khuẩn tả độc lực trong nguồn nước, và khi con người bắt đầu bị nhiễm bệnh và thải số lượng vi khuẩn ngày càng tăng vào môi trường, làm tăng thêm mật độ vi khuẩn và làm trầm trọng thêm đợt bùng phát. Mức độ nghiêm trọng của đợt bùng phát dịch có thể phụ thuộc vào mật độ thực khuẩn thể tả còn lại trong ổ chứa [60].

Thứ hai, nếu sự bùng phát dịch tả đã và đang xảy ra, thì sự xuất hiện của thể thực khuẩn có thể làm giảm mức độ nghiêm trọng của đợt bùng phát dịch và thúc đẩy sự suy giảm của nó. Sự suy giảm mật độ vi khuẩn tả cuối cùng là kết quả của việc gia tăng sự ly giải của thể thực khuẩn tả, đưa quần thể vi khuẩn tả ở ổ chứa trở lại mức trước khi bùng phát bệnh và chấm dứt đợt bùng phát dịch [78].

Trong cả hai tình huống trên, mức độ ảnh hưởng của thực khuẩn thể tả phụ thuộc chủ yếu vào sự ly giải và tỷ lệ tồn tại của thể thực khuẩn. Faruque và cộng sự [60] báo cáo rằng sự ly giải của thực khuẩn thể trên vi khuẩn tả gây bệnh có thể là một yếu tố bên ngoài quan trọng ảnh hưởng đến chu kỳ dịch bệnh ở quy mô thời gian ngắn và có thể tác động để thay đổi thời gian và mức độ nghiêm trọng của các đợt bùng phát dịch tả.

Trên cơ sở lý luận từ tổng quan tài liệu và kết quả nghiên cứu, chúng tôi khái quát hóa mô hình giám sát, cảnh báo dịch tả sau:



Sơ đồ 4. 1. Sơ đồ giám sát cảnh báo dịch tả dựa trên xét nghiệm mẫu nước ngoại cảnh

Trong đó có **06** tình huống xảy ra:

- **Tình huống 1:** TKTT(-) và VKT(-): tiếp tục giám sát định kỳ 01-02 tháng một lần.
- **Tình huống 2:** TKTT(-) và VKT(+) gen độc tố tả (+): đang giai đoạn dịch hoặc đã có sự đào thải vi khuẩn tả từ bệnh nhân ra môi trường. cần giám sát ngoại cảnh 15 ngày/lần + chủ động giám sát ca bệnh + xử lý nguồn nước bằng liệu pháp phage.
- **(3) Tình huống 3:** TKTT(-) và VKT(+) gen độc tố tả (-): cảnh báo có thể đã có dịch xảy ra, cần giám sát ngoại cảnh 15 ngày/lần + chủ động giám sát ca bệnh + xử lý nguồn nước bằng liệu pháp phage.
- **(4) Tình huống 4:** TKTT(+) và VKT(+) gen độc tố tả (+): đang giai đoạn dịch hoặc đã có sự đào thải vi khuẩn tả từ bệnh nhân ra môi trường. cần giám sát ngoại cảnh 15 ngày/lần + chủ động giám sát ca bệnh + xử lý nguồn

nước bằng liệu pháp phage.

- **(5) Tình huống 5:** TKTT(+) và VKT(+) gen độc tố tả (-): cảnh báo có thể đã có dịch xảy ra, cần giám sát ngoại cảnh 15 ngày/lần + chủ động giám sát ca bệnh + xử lý nguồn nước bằng liệu pháp phage.
- **(6) Tình huống 6:** TKTT(+) và VKT(-): cảnh báo nguy cơ sắp có dịch tả xảy ra, cần thực hiện giám sát 15 -30 ngày/1 lần.

Do đó, để có thể ứng dụng liệu pháp thực khuẩn thể trong phòng chống bệnh tả ở cộng đồng chúng tôi có một số đề xuất sau:

Một là, Viện Vệ sinh dịch tễ/Viện Pasteur phối hợp với Trung tâm kiểm soát bệnh tật các tỉnh/ thành phố có liên quan thường xuyên duy trì giám sát ngoại cảnh về sự hiện diện của thực khuẩn thể tả và vi khuẩn tả. Thông qua giám sát chúng ta có thể xác định được trạng thái cân bằng cho quần thể vi khuẩn tả và thực khuẩn thể tả. Việc giám sát định kỳ với thời gian thích hợp sẽ nhanh chóng phát hiện được sự mất cân bằng tỷ lệ vi khuẩn tả và thực khuẩn thể tả, chỉ điểm gợi ý cho một đợt dịch có thể sớm bùng phát. Trong nghiên cứu của chúng tôi đều phát hiện thấy thực khuẩn thể tả theo thời gian tại các 02 tháng một, nghĩa là việc lấy mẫu giám sát ngoại cảnh cần được tiến hành 02 tháng một lần. Tuy nhiên trong việc giám sát để phòng, chống dịch nên có thời gian hợp lý, có thể giãn ra vào thời kỳ không phải mùa dịch và thường xuyên hơn vào thời kỳ mùa dịch. Ở Việt Nam bệnh tả vẫn còn xảy ra thường vào mùa hè và ở các tỉnh ven biển [3]. Trong một số hệ thống giám sát ngoại cảnh bệnh tả, một số thời gian thu thập mẫu xét nghiệm được áp dụng là lấy mẫu mỗi 15 ngày hoặc 1 tháng/lần [50], [93], [159].

Hai là, trong trường hợp giám sát thấy có nguy cơ bùng phát dịch tả theo sơ đồ 4.1, cần phải áp dụng liệu pháp thực khuẩn thể. Để làm được điều này cần có sự sẵn sàng nguồn lực về thực khuẩn thể tả để sẵn sàng can thiệp khi cần thiết. Nếu xuất hiện ca bệnh, căn cứ vào mức độ nghiêm trọng của dịch bệnh

mà bổ sung số lượng tương ứng thể thực khuẩn tả vào ổ chứa để làm giảm quy mô của dịch bệnh. Trong báo cáo trước đây, Mark A Jensen và cộng sự (2006) đã nhận xét rằng, nếu có quá ít thể thực khuẩn (10^7 thực khuẩn thể trong một lít hoặc ít hơn) thì hầu như không có tác dụng gì đối với dịch bệnh [78]. Trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy thời gian tồn tại của thực khuẩn thể tùy theo nguồn nước có thể kéo dài từ 01 đến 03 tháng; tuy nhiên khả năng ly giải của thực khuẩn thể chỉ tối ưu từ 02 tuần đến 01 tháng tùy nguồn nước. Kết hợp với thời gian cho việc giám sát ngoại cảnh ở trên, chúng tôi đề xuất thời gian cho việc bổ sung thực khuẩn thể tả với mục đích tìm hãm vi khuẩn tả trong khoảng thời gian 15 ngày đến 01 tháng mỗi lần và tùy thuộc mức độ dịch bùng phát mà có thể điều chỉnh thời gian cho phù hợp.

Ba là, các đơn vị liên quan phải đảm bảo thông tin liên lạc kịp thời. Bộ phận lấy mẫu phải đảm bảo vận chuyển đúng yêu cầu kỹ thuật về phòng xét nghiệm đúng thời gian. Bộ phận xét nghiệm nhanh chóng triển khai xét nghiệm và có kết quả sớm nhất để báo lại cho bộ phận liên quan. Nếu có thông tin bất thường về giám sát (ca bệnh xuất hiện, ...), xét nghiệm (tỷ lệ hiện diện vi khuẩn tăng,...), bộ phận giám sát khẩn trương báo cáo lãnh đạo đơn vị và tuyên trên để có quyết định can thiệp nếu cần. Qua kinh nghiệm thực tế phòng chống dịch, việc kết quả xét nghiệm nhanh, chính xác, kịp thời sẽ là yếu tố quan trọng trong việc đưa ra quyết định can thiệp phòng chống dịch đúng thời điểm. Để làm được việc này cần chú trọng công tác tập huấn kỹ thuật xét nghiệm, duy trì và nâng cao năng lực xét nghiệm tại địa phương có điểm giám sát.

Bốn là, trong hoạt động giám sát và phòng chống dịch thì yếu tố nhân lực là quan trọng nhất. Các đơn vị từ Trung ương (Viện Vệ sinh dịch tễ/Viện Pasteur) cho đến tuyến tỉnh/huyện/xã đều cần có kế hoạch phân công nhân lực trong hoạt động giám sát và phòng, chống dịch; trong đó cần quy định rõ vai trò của nhân lực các tuyến như: cán bộ quản lý chỉ đạo, cán bộ giám sát thực

địa, cán bộ phòng xét nghiệm,... Do đây là công tác phòng, chống dịch thường xuyên nên nhân lực tham gia nên là cán bộ y tế đang công tác trong hệ thống y tế dự phòng, bổ sung thêm chức năng nhiệm vụ. Nhìn chung, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy thực khuẩn thể tả có thể tồn tại và duy trì được khả năng ly giải vi khuẩn tả trong điều kiện nước môi trường ngoại cảnh. Điều này ủng hộ cho khả năng sử dụng thực khuẩn thể tả để tìm hãm vi khuẩn tả trong môi trường nước ngoại cảnh, góp phần hạn chế sự bùng phát và quy mô vụ dịch tả.

Những đóng góp của nghiên cứu

Nghiên cứu này là một trong số rất ít nghiên cứu tại Việt Nam được thực hiện và có một số kết quả như sau:

1. Bước đầu xác định và mô tả sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trên một diện rộng môi trường cộng đồng địa lý dân cư (04 tỉnh/thành phố miền Bắc Việt Nam), với cỡ mẫu là 800 mẫu.

2. Đánh giá được khả năng ly giải của toàn bộ 36 chủng thực khuẩn thể tả có trong nghiên cứu ở các điều kiện (nhiệt độ, pH, độ pha loãng) khác nhau nhạy cảm với các chủng vi khuẩn tả có phân loại tít sinh học Classical (Cổ điển), El tor, O139 Bengal, ...) tại Phòng Thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Đánh giá được khả năng ly giải và thời gian tồn tại ở điều kiện môi trường ngoại cảnh của 01 chủng thực khuẩn thể có đặc tính vượt trội (VP04) về khả năng ly giải trong tổng số 36 chủng.

3. Đề xuất một số biện pháp can thiệp để hạn chế sự bùng phát dịch tả bằng sơ đồ giám sát cảnh báo dịch tả dựa trên xét nghiệm mẫu nước ngoại cảnh, qua đó góp phần định hướng đề xuất chiến lược nghiên cứu tuyển chọn thực khuẩn thể tả để sử dụng trong dự phòng, kiểm soát dịch bệnh tả, xử lý nguồn nước sinh hoạt bị ô nhiễm tiến tới ứng dụng trong điều trị bệnh tả; trong nuôi trồng thủy sản, công nghiệp thực phẩm và bảo quản.

Hạn chế của nghiên cứu

Do hạn chế về nguồn lực, nghiên cứu mới: (1) bước đầu xác định được sự tồn tại của thực khuẩn thể tả và đánh giá được một số đặc điểm sinh học của các thực khuẩn thể tả tại các điểm nghiên cứu; (2) đánh giá được sự tồn tại và khả năng ly giải của 01/36 loại thực khuẩn thể tả trong điều kiện môi trường ngoại cảnh giả định mà chưa tiến hành thử nghiệm khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoại cảnh tự nhiên.

Để đánh giá một cách toàn diện hơn sự tồn tại và khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoại cảnh trên thực tế, cần có: (1) những nghiên cứu bổ sung, phát triển thêm để tuyển chọn được nhiều chủng thực khuẩn thể tả có ưu thế ly giải các chủng vi khuẩn tả; (2) áp dụng liệu pháp thực khuẩn thể trong điều kiện môi trường nước ngoại cảnh tự nhiên (với các điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm, lưu lượng dòng chảy, các tính chất lý hóa của nước tự nhiên ...) để đánh giá chính xác hơn về hiệu quả, tính hữu dụng của liệu pháp thực khuẩn thể tả trong phòng chống dịch tả tại Việt Nam.

KẾT LUẬN

1. Sự lưu hành của thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoài cảnh tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, năm 2018-2019

- Tỷ lệ thực khuẩn thể phân lập được từ mẫu nước bề mặt là 8/400 (2%); mẫu môi gạc tôm là 2/400 (0,5%). Phát hiện thấy sự có mặt của thực khuẩn thể tả tại Thái Bình và Hải Phòng. Không phát hiện thấy sự có mặt của thực khuẩn thể tả tại Hà Nội và Nam Định.

- Thực khuẩn thể dạng sợi (filamentous phage 1 - fs1, filamentous phage 2 - fs2) phát hiện thấy ở 4/4 điểm nghiên cứu, 62/400 (15,5%) trong mẫu nước bề mặt và 124/400 (31,0%) trong mẫu môi gạc tôm, xuất hiện phổ biến ở các điểm nghiên cứu đặc biệt là các tỉnh ven biển như Hải Phòng, Thái Bình và Nam Định.

2. Khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả

2.1. Trong các điều kiện khác nhau tại phòng thí nghiệm

- Thực khuẩn thể tả phân lập được tại miền Bắc Việt Nam có khả năng ly giải với các chủng tả O1, O139; không phát hiện thấy sự ly giải với một số chủng vi khuẩn gây bệnh đường ruột khác.

- Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả được thấy ở điều kiện: pha loãng trên 1000 thực khuẩn thể trên 1 ml dung dịch; pH từ 4,0 đến 10,0; nhiệt độ môi trường từ 15⁰C đến 41⁰C.

2.2. Đối với các nguồn nước cộng đồng

- **Khả năng tồn tại của thực khuẩn thể tả:** Nhóm nước máy/nước mưa khả năng tồn tại đến 1 tháng; nước dòng chảy tự nhiên (sông/suối) khả năng tồn tại đến 3 tháng; còn nước không thường xuyên lưu chuyển (giếng/ao/hồ) khả năng tồn tại đến 3 tháng.

- **Khả năng ly giải của thực khuẩn thể tả với vi khuẩn tả:** Nhóm nước

máy/nước mưa khả năng ly giải đến 2 tuần; nước dòng chảy tự nhiên (sông/suối) và nước không thường xuyên lưu chuyển (giếng/ao/hồ) khả năng ly giải đến 1 tháng.

KHUYẾN NGHỊ

Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi đưa ra một số khuyến nghị:

1. Bộ Y tế cho phép nghiên cứu, áp dụng thí điểm một số biện pháp can thiệp để hạn chế sự bùng phát dịch tả dựa trên xét nghiệm mẫu nước ngoài cảnh.
2. Viện Vệ sinh dịch tễ/Viện Pasteur phối hợp với Trung tâm kiểm soát bệnh tật các tỉnh/thành phố có liên quan tiếp tục giám sát định kỳ xác định sự có mặt của vi khuẩn tả và thực khuẩn thể tả tại các địa điểm nghiên cứu để phục vụ cho công tác dự báo phòng, chống dịch tả một cách chủ động.
3. Cần có những nghiên cứu tiếp theo, nhất là nghiên cứu trên môi trường nước tự nhiên để xác định thêm các đặc tính của các chủng thực khuẩn thể tả nhằm tuyển chọn bộ chủng thực khuẩn thể tả đáp ứng yêu cầu xử lý các nguồn nước ô nhiễm vi khuẩn tả, đặc biệt áp dụng liệu pháp thực khuẩn thể đối với các chủng vi khuẩn tả đa kháng thuốc.

CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ

1. Lại Vũ Kim, Nguyễn Đồng Tú, Đặng Đức Nhu, Lê Đăng Hải, Ngô Tuấn Cường, Nguyễn Hoài Thu, Lê Thanh Hương, Đặng Đức Anh. Sự lưu hành và đặc điểm của một số thực khuẩn thể tả (Vibriophage) phân lập tại miền Bắc Việt Nam. Tạp chí Y học dự phòng. 2019; 29(13): 88 – 102.
2. Lại Vũ Kim, Nguyễn Đồng Tú, Đặng Đức Nhu, Lê Thanh Hương, Vũ Thị Mai Hiền, Ngô Tuấn Cường, Hoàng Thị Thu Hà. Đặc tính của thực khuẩn thể tả lytic (thực khuẩn tả tan) VP14 phân lập được tại tỉnh Thái Bình năm 2009. Tạp chí Y học dự phòng. 2022; 32(3): 63 – 70.
3. Lại Vũ Kim, Lê Thanh Hương, Đặng Đức Nhu, Vũ Hải Hà, Ngô Tuấn Cường, Hoàng Thị Thu Hà, Nguyễn Đồng Tú, Vũ Thị Mai Hiền. Sự lưu hành của Thực khuẩn thể tả trong môi trường nước ngoài cảnh tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2018-2019. Tạp chí Y học dự phòng. 2023; 33(2): 29 – 41.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Bộ môn Dịch tễ học, Khoa Y tế công cộng, Trường Đại học Y Dược Huế (2006), *Giáo trình Dịch tễ học*, Trường Đại học Y Dược Huế, tr. 93-94.
2. Bộ Y tế (2007), *Cẩm nang triển khai công tác phòng chống bệnh tả*, Hà Nội.
3. Bộ Y tế (2007), Quyết định số 4178/QĐ-BYT ngày 31/10/2007 về việc ban hành "Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị bệnh tả".
4. Bộ Y tế (2011), *Niên giám thống kê bệnh truyền nhiễm năm 2010*.
5. Bộ Y tế (2016), Quyết định số 4283/QĐ-BYT ngày 08/8/2016 về việc ban hành tài liệu "Định nghĩa trường hợp bệnh truyền nhiễm".
6. Phùng Đắc Cam (2003), *Vibrio cholerae và bệnh dịch tả*, Nhà xuất bản Y học.
7. Cục Y tế dự phòng Việt Nam *Bệnh tả*, truy cập ngày 10/03/2023, tại trang web <https://vncdc.gov.vn/benh-tand14498.html>.
8. Ngô Tuấn Cường, Nguyễn Đồng Tú, Nguyễn Hoài Thu, cộng sự (2008), "Giám sát Vibrio cholerae O1 và Vibriophage trong môi trường nước ngoại cảnh và các yếu tố dự báo dịch", *Tạp chí y học Dự phòng*. 4(96), tr. 13-18.
9. Ngô Tuấn Cường, Nguyễn Đồng Tú, Nguyễn Hoài Thu, cộng sự (2008), "Nghiên cứu thực khuẩn thể tả thu thập được tại mẫu nước ngoại cảnh tại Thái Bình", *Tạp chí Y học Dự phòng*. 4(96), tr. 19-23.
10. Đinh Hữu Dung (2001), *Vibrio cholerae. Vi sinh vật Y học*, Nhà xuất bản Y học, Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y Hà Nội.
11. Nguyễn Thị Đâu (2015), *Nghiên cứu đặc điểm di truyền và tính kháng thuốc của Vibrio cholerae phân lập tại tỉnh Trà Vinh*, Đại học Cần Thơ.

12. Nguyễn Xuân Hòa, Dildar Hussain Kalhoro, Chengping Lu (2013), "Sự phân bố của nhóm huyết thanh và độc lực của vi khuẩn E. Coli phân lập từ lợn con sau cai sữa bị bệnh tiêu chảy trên địa bàn tỉnh ThừaThiên – Huế, Việt Nam", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 11(4), tr. 665 - 672.
13. Lại Vũ Kim, Nguyễn Đồng Tú, Đặng Đức Nhu, cộng sự (2019), "Sự lưu hành và đặc điểm của một số thực khuẩn thể tả (Vibriophage) phân lập tại miền Bắc Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*. 29(13), tr. 88-102.
14. Lại Vũ Kim, Nguyễn Đồng Tú, Đặng Đức Nhu, cộng sự (2022), "Đặc tính của thực khuẩn thể tả lytic (thực khuẩn tả tan) VP14 phân lập được tại tỉnh Thái Bình năm 2009", *Tạp chí Y học Dự phòng*. 32(3 Phụ bản), tr. 63-70.
15. Nguyễn Thùy Linh, Nguyễn Thị Đâu, Hồ Việt Thu, cộng sự (2014), "Tỉ lệ nhiễm và sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn Vibrio spp. phân lập từ huyết heo, nghêu và phân bệnh nhân tiêu chảy tại tỉnh Trà Vinh", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 33(2014), tr. 61-67.
16. Quốc hội (2020), Luật Bảo vệ môi trường số 72/2020/QH14 ngày 17/11/2020 của Quốc hội, có hiệu lực kể từ ngày 01/01/2022, Quốc hội, Hà Nội.
17. Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương *Niên giám thống kê bệnh truyền nhiễm khu vực phía Bắc năm 2000-2008*.
18. Nguyễn Thị Thu Yến, Trần Như Dương, Nguyễn Thị Bình Minh, Phạm Thị Cẩm Hà (2009), "Yếu tố nguy cơ mắc bệnh tả tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam năm 2008", *Tạp chí Y học dự phòng tháng 11 năm 2009*.

TIẾNG ANH

19. Abedon Stephen T, Kuhl Sarah J, Blasdel Bob G, et al (2011), "Phage treatment of human infections", *Bacteriophage*. 1(2), tr. 66-85.
20. Ackermann Hans-W (2006), "Classification of bacteriophages", *The bacteriophages*. 2, tr. 8-16.

21. Ackermann Hans-W, Tremblay Denise, Moineau Sylvain (2004), "Long-term bacteriophage preservation", *WFCC Newsl.* 38, tr. 35-40.
22. Ars Norbert, Gambino Michela, Brøndsted Lone (2020), "Bacteriophage enumeration and detection methods", *Frontiers in microbiology*, tr. 2662.
23. Al-Fendi Ali, Shueb Rafidah Hanim, Ravichandran Manickam, et al (2014), "Isolation and characterization of lytic vibriophage against *Vibrio cholerae* O1 from environmental water samples in Kelantan, Malaysia", *Journal of basic microbiology*. 54(10), tr. 1036-1043.
24. Angermeyer Angus, Das Moon Moon, Singh Durg Vijai, et al (2018), "Analysis of 19 highly conserved *Vibrio cholerae* bacteriophages isolated from environmental and patient sources over a twelve-year period", *Viruses*. 10(6), tr. 299.
25. Lopez Anna Lena, Maria Liza Antoinette, Josephine G Aldaba, et al (2014), "Killed oral cholera vaccines: history, development and implementation challenges", *Therapeutic advances in vaccines*. 2(5), tr. 123-136.
26. Asheshov Igor N, Asheshov Inna, Khan Saranjan, et al (1930), "Bacteriophage inquiry. Report on the work during the period from 1st January to 1st September, 1929", *Indian J Med Res*. 17(3), tr. 971-84.
27. Atamer Zeynep, Dietrich Jochen, Müller-Merbach Mareile, et al (2009), "Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance", *International Dairy Journal*. 19(4), tr. 228-235.
28. Barrow PA (2001), "The use of bacteriophages for treatment and prevention of bacterial disease in animals and animal models of human infection", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 76(7), tr. 677-682.

29. Barrow Paul A, Soothill James S (1997), "Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential", *Trends in microbiology*. 5(7), tr. 268-271.
30. Basdew Iona H, Laing Mark D (2014), "Stress sensitivity assays of bacteriophages associated with *Staphylococcus aureus*, causal organism of bovine mastitis", *African J Microbiol Res*. 8, tr. 200-210.
31. Bhandare Sudhakar, Colom Joan, Baig Abiyad, Jenny M Ritchie, et al (2019), "Reviving phage therapy for the treatment of cholera", *The Journal of infectious diseases*. 219(5), tr. 786-794.
32. Bogovazova GG, Voroshilova NN, Bondarenko VM (1991), "The efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in the therapy of experimental *Klebsiella* infection", *Zhurnal mikrobiol epidemiol immunobiol* (4), tr. 5-8.
33. Bogovazova GG, Voroshilova NN, Bondarenko VM, et al (1992), "Immunobiological properties and therapeutic effectiveness of preparations from *Klebsiella* bacteriophages", *Zhurnal mikrobiol epidemiol immunobiol* (3), tr. 30-33.
34. Brady T Scott, Roll Charles R, Walker Jamison K, et al (2021), "Phages bind to vegetative and spore forms of *Paenibacillus larvae* and to vegetative *Brevibacillus laterosporus*", *Frontiers in Microbiology*. 12, tr. 588035.
35. Braine Theresa (2011), "Race against time to develop new antibiotics", *World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization*. 89(2), tr. 88.
36. Breitbart Mya, Wegley Linda, Leeds Steven, et al (2004), "Phage community dynamics in hot springs", *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3), tr. 1633-1640.

37. Bruynoghe RAJM, Maisin J (1921), "Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage", *CR Soc Biol.* 85, tr. 1120-1121.
38. Buzrul Sencer, Öztürk Pınar, Alpas Hami, et al (2007), "Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages", *LWT-Food Science and Technology.* 40(10), tr. 1671-1677.
39. Bwire Godfrey, Sack David A, Kagirita Atek, et al (2020), "The quality of drinking and domestic water from the surface water sources (lakes, rivers, irrigation canals and ponds) and springs in cholera prone communities of Uganda: an analysis of vital physicochemical parameters", *BMC Public Health.* 20(1), tr. 1-18.
40. Caldeira Jerri C, Peabody David S (2007), "Stability and assembly in vitro of bacteriophage PP7 virus-like particles", *Journal of nanobiotechnology.* 5, tr. 1-10.
41. Cazares Adrián, García-Contreras Rodolfo, Pérez-Velázquez Judith (2020), "Eco-evolutionary effects of bacterial cooperation on phage therapy: an unknown risk?", *Frontiers in Microbiology.* 11, tr. 590294.
42. Centers for Disease Control and Prevention *How Infections Spread*, truy cập ngày 16/10/2023, tại trang web <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/spread/index.html>.
43. Chakrabarti AK, Ghosh AN, Nair G Balakrish, et al (2000), "Development and evaluation of a phage typing scheme for *Vibrio cholerae* O139", *Journal of clinical microbiology.* 38(1), tr. 44-49.
44. Chang C, Yu X, Guo W, et al (2022), Bacteriophage-mediated control of biofilm: a promising new dawn for the future. *Front Microbiol* 2022; 13: 825828.
45. Chanishvili Nina (2012), "A literature review of the practical application of bacteriophage research", *A Literature Review of the Practical Application of Bacteriophage Research*, tr. 1-292.

46. Clokie Martha RJ, Millard Andrew D, Letarov Andrey V, et al (2011), "Phages in nature", *Bacteriophage*. 1(1), tr. 31-45.
47. Constance Bradley (2014), "A Shot in the Arm for Philosophy of Biology: How to Treat Infectious Diseases", *SAGE Open*. 4(1), tr. 2158244014529134.
48. Crowcroft NS (1994), "Communicable Disease Review".
49. Dalsgaard A, Forslund A, Tam NV, et al (1999), "Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of class I integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from 1979 to 1996", *Journal of clinical microbiology*. 37(3), tr. 734-741.
50. Debes Amanda K, Ateudjieu Jerome, Guenou Etienne, et al (2016), "Clinical and environmental surveillance for *Vibrio cholerae* in resource constrained areas: application during a 1-year surveillance in the far north region of Cameroon", *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 94(3), tr. 537.
51. Deresinski Stan (2009), "Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas", *Clinical infectious diseases*. 48(8), tr. 1096-1101.
52. d'Herelle Felix (1930), "The bacteriophage and its clinical applications", *The Bacteriophage and its Clinical Applications*.
53. d'Herelle Felix, Malone Reginald Hampstead, Lahiri Mahendra Nath (1930), "Studies on Asiatic cholera", *Studies on Asiatic Cholera*.(Memoir No. 14).
54. d'Herelle F (1931), "Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections", *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 7(5), tr. 329-348.
55. Dutta Devarati, Chowdhury Goutam, Pazhani Gururaja P, et al (2013), "*Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like

- diarrhea, Kolkata, India", *Emerging infectious diseases*. 19(3), tr. 464.
56. Ehara M, Nguyen BM, Nguyen DT, et al (2004), "Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic *Vibrio cholerae* O1 in Vietnam", *Epidemiology & Infection*. 132(4), tr. 595-600.
 57. Endersen Lorraine, O'Mahony Jim, Hill Colin, et al (2014), "Phage therapy in the food industry", *Annual review of food science and technology*. 5, tr. 327-349.
 58. Faruque Shah M, Islam M Jahirul, Ahmad Qazi Shafi, et al (2005), "Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: role of host-mediated amplification of phage", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(17), tr. 6119-6124.
 59. Faruque ASG, Fuchs GJ, Albert M John (1996), "Changing epidemiology of cholera due to *Vibrio cholerae* O1 and O139 Bengal in Dhaka, Bangladesh", *Epidemiology & Infection*. 116(3), tr. 275-278.
 60. Faruque Shah M, Naser Iftexhar Bin, Islam M Jahirul, et al (2005), "Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(5), tr. 1702-1707.
 61. Faruque Shah M, Nair G Balakrish (2008), *Vibrio cholerae: genomics and molecular biology*, Horizon Scientific Press.
 62. Fauconnier Alan (2019), "Phage therapy regulation: from night to dawn", *Viruses*. 11(4), tr. 352.
 63. Fauconnier Alan, Nagel Tobi E, Fauconnier Charlotte, et al (2020), "The unique role that WHO could play in implementing phage therapy to combat the global antibiotic resistance crisis", *Frontiers in Microbiology*. 11, tr. 1982.

64. Fernández Lucía, Gutiérrez Diana, García Pilar, et al (2019), "The perfect bacteriophage for therapeutic applications—a quick guide", *Antibiotics*. 8(3), tr. 126.
65. Flores Cesar O, Meyer Justin R, Valverde Sergi, Lauren Farr, et al (2011), "Statistical structure of host–phage interactions", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(28), tr. E288-E297.
66. Frisch Arthur W, Levine Philip (1936), "Specificity of the Multiplication of Bacteriophage", *The Journal of Immunology*. 30(1), tr. 89-108.
67. Gao Lu, Ouyang Min, Li Yi, et al (2022), "Isolation and Characterization of a Lytic Vibriophage OY1 and Its Biocontrol Effects Against *Vibrio* spp", *Frontiers in Microbiology*. 13, tr. 830692.
68. García P, Madera C, Martinez B, et al (2009), "Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents", *Journal of dairy science*. 92(7), tr. 3019-3026.
69. Grime John Philip, Hodgson John G, Hunt Roderick (1988), *Comparative plant ecology: a functional approach to common British species*, UnwinHyman, London.
70. Groman NB (1962), "Temperature and the reproduction of lambda-phage mutants", *J Bacteriol*. 84(3), tr. 438-45.
71. Haines Melissa EK, Hodges Francesca E, Nale Janet Y, et al (2021), "Analysis of selection methods to develop novel phage therapy cocktails against antimicrobial resistant clinical isolates of bacteria", *Frontiers in Microbiology*. 12, tr. 613529.
72. Hankin E (1896), "L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera", *Ann Inst Pasteur*. 10, tr. 511.

73. Hurst Christon J, Gerba Charles P, Cech Irina (1980), "Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil", *Applied and environmental microbiology*. 40(6), tr. 1067-1079.
74. Hyman Paul (2019), "Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth", *Pharmaceuticals*. 12(1), tr. 35.
75. ICMR BULLETIN (2002), "Cholera Bacteriophages Revisited". 32(4).
76. Jaiswal Abhishek, Koley Hemanta, Mitra Soma, et al (2014), "Comparative analysis of different oral approaches to treat *Vibrio cholerae* infection in adult mice", *International Journal of Medical Microbiology*. 304(3-4), tr. 422-430.
77. Jamal Muhsin, Hussain Tahir, Das Chythanya Rajanna, et al (2015), "Isolation and characterization of a Myoviridae MJ1 bacteriophage against multi-drug resistant *Escherichia coli* 3", *Jundishapur journal of microbiology*. 8(11).
78. Jensen Mark A, Faruque Shah M, Mekalanos John J, et al (2006), "Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(12), tr. 4652-4657.
79. Jepson Catherine, March John B (2004), "Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle", *Vaccine*. 22(19), tr. 2413-2419.
80. Jia Kaixiang, Yang Nuo, Zhang Xiuwen, et al (2020), "Genomic, morphological and functional characterization of virulent bacteriophage IME-JL8 targeting *Citrobacter freundii*", *Frontiers in Microbiology*. 11, tr. 585261.
81. Jończyk-Matysiak Ewa, Popiela Ewa, Owczarek Barbara, et al (2020), "Phages in therapy and prophylaxis of american foulbrood—recent implications from practical applications", *Frontiers in microbiology*. 11,

tr. 1913.

82. Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, et al (2011), "The influence of external factors on bacteriophages", *Folia microbiologica*. 56, tr. 191-200.
83. Jutta Nesper, Julia Blaß, Michael Fountoulakis (1999), "Characterization of the major control region of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139: immunity, exclusion, and integration", *Journal of bacteriology*. 181(9), tr. 2902-2913.
84. Khalid Ali, Lin Ruby CY, Iredell Jonathan R (2021), "A phage therapy guide for clinicians and basic scientists: background and highlighting applications for developing countries", *Frontiers in Microbiology*. 11, tr. 599906.
85. Kutter Elizabeth, Sulakvelidze Alexander (2004), *Bacteriophages: biology and applications*, Crc press.
86. Kutter Elizabeth, Goldman E, Green LH (2008), "Phage therapy: bacteriophages as naturally occurring antimicrobials", *Practical handbook of microbiology*, tr. 713-730.
87. Kutter Elizabeth, De Vos Daniel, Gvasalia Guram, et al (2010), "Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections", *Current pharmaceutical biotechnology*. 11(1), tr. 69-86.
88. Lang G, Kehr P, Mathevon H, et al (1979), "Bacteriophage therapy of septic complications of orthopaedic surgery (author's transl", *Revue de chirurgie orthopedique et reparatrice de l'appareil moteur*. 65(1), tr. 33-37.
89. Larry McKane, Judy Kandel (1996), *Microbiology: essential and application*, New York : McGraw-Hill.

90. Lee Yoona, Son Bokyoung, Cha Yoyeon, et al (2021), "Characterization and genomic analysis of PALS2, a novel Staphylococcus jumbo bacteriophage", *Frontiers in Microbiology*. 12, tr. 622755.
91. Bruce R Levin, Bull JJ (1996), "Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics", *The American Naturalist*. 147(6), tr. 881-898.
92. Loc-Carrillo C, Abedon ST (2011), Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 1: 111–114.
93. Madico Guillermo, Checkley William, Gilman Robert H, et al (1996), "Active surveillance for *Vibrio cholerae* O1 and vibriophages in sewage water as a potential tool to predict cholera outbreaks", *Journal of clinical microbiology*. 34(12), tr. 2968-2972.
94. Marčuk LM, Nikiforov VN, Ščerbak Ja F, et al (1971), "Clinical studies of the use of bacteriophage in the treatment of cholera", *Bulletin of the World Health Organization*. 45(1), tr. 77.
95. Matsuzaki Shigenobu, Uchiyama Jumpei, Takemura-Uchiyama Iyo, et al (2014), "Perspective: The age of the phage", *Nature*. 509(7498), tr. S9-S9.
96. Miller Robert V, Day M (2008), "Contribution of lysogeny, pseudolysogeny, and starvation to phage ecology", *Bacteriophage ecology*. 114, tr. 143.
97. Mocé-Llivina Laura, Muniesa Maite, Pimenta-Vale Hugo, et al (2003), "Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage", *Applied and Environmental microbiology*. 69(3), tr. 1452-1456.
98. Monsur KA, Rahman MA, Huq F, et al (1970), "Effect of massive doses of bacteriophage on excretion of vibrios, duration of diarrhoea and

output of stools in acute cases of cholera", *Bulletin of the World Health Organization*. 42(5), tr. 723.

99. Morison John (1932), "Bacteriophage in the Treatment and Prevention of Cholera", *Bacteriophage in the Treatment and Prevention of Cholera*.
100. Mullan WMA (2001), *Bacteriophage isolation and purification.*, truy cập ngày 16/10/2023, tại trang web <http://www.dairyscience.info/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html>.
101. Nair Aparna, Ghugare Gaurav S, Khairnar Krishna (2022), "An appraisal of bacteriophage isolation techniques from environment", *Microbial ecology*, tr. 1-17.
102. Nakai Toshihiro, Park Se Chang (2002), "Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture", *Research in microbiology*. 153(1), tr. 13-18.
103. Nale Janet Y, Vinner Gurinder K, Lopez Viviana C, et al (2021), "An optimized bacteriophage cocktail can effectively control Salmonella in vitro and in Galleria mellonella", *Frontiers in microbiology*. 11, tr. 609955.
104. Nalin DR, Daya V, Reid A, et al (1979), "Adsorption and growth of Vibrio cholerae on chitin", *Infection and Immunity*. 25(2), tr. 768-770.
105. Naser Iftexhar Bin, Hoque M Mozammel, Nahid M Ausrafuggaman, et al (2017), "Analysis of the CRISPR-Cas system in bacteriophages active on epidemic strains of Vibrio cholerae in Bangladesh", *Scientific Reports*. 7(1), tr. 14880.
106. Nasser Abid M, Oman Samuel D (1999), "Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources", *Water Research*. 33(7), tr. 1748-1752.
107. Nelson Eric J, Chowdhury Ashrafuzzaman, Flynn James, et al (2008),

- "Transmission of *Vibrio cholerae* is antagonized by lytic phage and entry into the aquatic environment", *PLoS pathogens*. 4(10), tr. e1000187.
108. Nelson Eric J, Harris Jason B, Glenn Morris Jr, et al (2009), "Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic", *Nature Reviews Microbiology*. 7(10), tr. 693-702.
 109. Ng Renee N, Tai Anna S, Chang Barbara J., et al (2021), "Overcoming challenges to make bacteriophage therapy standard clinical treatment practice for cystic fibrosis", *Frontiers in Microbiology*. 11, tr. 593988.
 110. Nguyen Hoa Anh, Tomita Toshio, Hirota Morihiko, et al (2001), "DNA inversion in the tail fiber gene alters the host range specificity of carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin of phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er", *Journal of bacteriology*. 183(21), tr. 6274-6281.
 111. Nguyen Binh Minh, Lee Je Hee, Cuong Ngo Tuan, et al (2009), "Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype strain producing classical cholera toxin B in Vietnam in 2007 to 2008", *Journal of clinical microbiology*. 47(5), tr. 1568-1571.
 112. Olson Matthew R, Axler Richard P, Hicks Randall E (2004), "Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability", *Journal of virological methods*. 122(2), tr. 147-152.
 113. Pal Subharthi (2015), "Phage Therapy an alternate disease control in Aquaculture: A review on recent advancements", *J. Agric. Vet. Sci.* 8, tr. 68-81.
 114. Paramasivam Kameshpandian, Shen Yuanzhao, Yuan Jiasheng, et al (2022), "Advances in the Development of Phage-Based Probes for Detection of Bio-Species", *Biosensors*. 12(1), tr. 30.

115. Pasricha CL, De Monte AJ, Gupta SK (1931), "Seasonal variations of cholera bacteriophage in natural waters and in man, in Calcutta during the year 1930", *The Indian Medical Gazette*. 66(10), tr. 543.
116. Pirnay Jean-Paul (2020), "Phage therapy in the year 2035", *Frontiers in Microbiology*. 11, tr. 1171.
117. Pirnay Jean-Paul, De Vos Daniel, Verbeken Gilbert, et al (2011), "The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or sur-mesure?", *Pharmaceutical research*. 28, tr. 934-937.
118. Pollard Ernest, Woodyatt Suzanne (1964), "The effect of temperature on the formation of T1 and T2r bacteriophage", *Biophysical Journal*. 4(5), tr. 367-385.
119. Pope Welkin H, Haase-Pettingell, King Jonathan (2004), "Protein folding failure sets high-temperature limit on growth of phage P22 in Salmonella enterica serovar Typhimurium", *Applied and environmental microbiology*. 70(8), tr. 4840-4847.
120. Rider Ashley C, Frazee Bradley W (2018), "Community-acquired pneumonia", *Emergency Medicine Clinics*. 36(4), tr. 665-683.
121. Ripp Steven, Miller Robert V (1997), "The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment", *Microbiology*. 143(6), tr. 2065-2070.
122. Sarkar Anirban, Morita Daichi, Ghosh Amit, et al (2019), "Altered integrative and conjugative elements (ICEs) in recent Vibrio cholerae O1 isolated from cholera cases, Kolkata, India", *Frontiers in Microbiology*. 10, tr. 2072.
123. Sarkar BL, Ghosh Amar N, Sen Anindito, et al (2004), "Newly isolated Vibrio cholerae non-O1, non-O139 phages", *Emerging infectious diseases*. 10(4), tr. 754.

124. Schless Robert A (1932), "Staphylococcus aureus meningitis: treatment with specific bacteriophage", *American Journal of Diseases of Children*. 44(4), tr. 813-822.
125. Scholl Dean, Rogers Scott, Adhya Sankar, et al (2001), "Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of Escherichia coli", *Journal of virology*. 75(6), tr. 2509-2515.
126. Science Direct Topics *Bacteriophage - an overview*, truy cập ngày 16/10/2023, tại trang web <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/bacteriophage>.
127. Science Direct Topics *Vibriophage - an overview*, truy cập ngày 16/10/2023, tại trang web <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/vibriophage>.
128. Science Direct Topics *Myoviridae - an overview* truy cập ngày 16/10/2023, tại trang web <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/myoviridae>.
129. Science Direct Topics *Podoviridae - an overview* truy cập ngày 16/10/2023, tại trang web <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/podoviridae>.
130. Science Direct Topics *Siphoviridae - an overview* truy cập ngày 16/10/2023, tại trang web <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/siphoviridae>.
131. Seed Kimberley D, Bodi Kip L, Kropinski Andrew M, et al (2011), "Evidence of a dominant lineage of Vibrio cholerae-specific lytic bacteriophages shed by cholera patients over a 10-year period in Dhaka,

- Bangladesh", *MBio*. 2(1), tr. 10.1128/mbio. 00334-10.
132. Silva Yolanda J, Costa Liliana, Pereira Carla, et al (2014), "Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production", *PloS one*. 9(12), tr. e114197.
 133. Smith H Williams, Huggins MB (1982), "Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics", *Microbiology*. 128(2), tr. 307-318.
 134. Smith H Williams, Huggins MB (1983), "Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs", *Microbiology*. 129(8), tr. 2659-2675.
 135. Smith H Williams, Huggins Michael B, Shaw Kathleen M (1987), "The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages", *Microbiology*. 133(5), tr. 1111-1126.
 136. Solís-Sánchez Alejandro, Hernández-Chiñas Ulises, Navarro-Ocaña Armando, et al (2016), "Genetic characterization of ØVC8 lytic phage for *Vibrio cholerae* O1", *Virology Journal*. 13(1), tr. 1-15.
 137. Son Bokyoung, Kong Minsuk, Lee Yoona, et al (2021), "Development of a novel chimeric endolysin, Lys109 with enhanced lytic activity against *Staphylococcus aureus*", *Frontiers in Microbiology*. 11, tr. 615887.
 138. Soothill JS (1994), "Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*", *Burns*. 20(3), tr. 209-211.
 139. Sulakvelidze Alexander, Alavidze Zemphira, Morris Jr J Glenn (2001), "Bacteriophage therapy", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45(3), tr. 649-659.
 140. Surekhamol IS, Deepa GD, Somnath Pai S, et al (2014), "Isolation and characterization of broad spectrum bacteriophages lytic to *Vibrio harveyi* from shrimp farms of Kerala, India", *Letters in applied microbiology*. 58(3), tr. 197-204.

141. Suttle Curtis A (2005), "Viruses in the sea", *Nature*. 437(7057), tr. 356-361.
142. Taj MK, Ling JX, Bing LL, et al (2014), "Effect of dilution, temperature and pH on the lysis activity of T4 phage against E. coli bl21", *J. Anim. Plant Sci.* 24(4), tr. 1252-1255.
143. Talledo Miguel, Rivera Irma NG, Lipp Erin K, et al (2003), "Characterization of a Vibrio cholerae phage isolated from the coastal water of Peru", *Environmental microbiology*. 5(5), tr. 350-354.
144. Tey Beng Ti, Ooi Shin Tean, Yong Khang Chi, et al (2009), "Production of fusion m13 phage bearing the di-sulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen", *African Journal of Biotechnology*. 8(2), tr. 268.
145. Thorne CB, Holt SC (1974), "Cold liability of Bacillus cereus bacteriophage CP-51", *J Virol.* 14, tr. 1006–1012
146. Tran Huu Dat, Alam Munirul, Trung Nguyen Vu, et al (2012), "Multi-drug resistant Vibrio cholerae O1 variant El Tor isolated in northern Vietnam between 2007 and 2010", *Journal of medical microbiology*. 61(Pt 3), tr. 431.
147. Twort Frederick W (1961), "An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses", *Acta Kravsi*.
148. Vale PF, Stjernman Martin, Little TJ (2008), "Temperature-dependent costs of parasitism and maintenance of polymorphism under genotype-by-environment interactions", *Journal of evolutionary biology*. 21(5), tr. 1418-1427.
149. Van Belleghem Jonas D, Manasherob Robert, Międzybrodzki Ryszard, et al (2020), "The rationale for using bacteriophage to treat and prevent periprosthetic joint infections", *Frontiers in Microbiology*. 11, tr. 591021.

150. Wang Lei, Tkhilaishvili Tamta, Trampuz Andrej, et al (2020), "Evaluation of staphylococcal bacteriophage Sb-1 as an adjunctive agent to antibiotics against rifampin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms", *Frontiers in microbiology*. 11, tr. 602057.
151. Warren James C, Hatch Melvin T (1969), "Survival of T3 coliphage in varied extracellular environments. I. Viability of the coliphage during storage and in aerosols", *Applied Microbiology*. 17(2), tr. 256-261.
152. Watanabe Ryohei, Matsumoto Tetsuya, Sano Go, et al (2007), "Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 51(2), tr. 446-452.
153. Weinbauer Markus G (2004), "Ecology of prokaryotic viruses", *FEMS microbiology reviews*. 28(2), tr. 127-181.
154. Whitman PA, Marshall RT (1971), "Characterization of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef", *Applied microbiology*. 22(3), tr. 463-468.
155. Yang Hongjiang, Liang Li, Lin Shuxiang, et al (2010), "Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*", *BMC microbiology*. 10, tr. 1-10.
156. Yates Marylynn Villinski, Gerba Charles P, Kelley Lee M. (1985), "Virus persistence in groundwater", *Applied and environmental microbiology*. 49(4), tr. 778-781.
157. Yen Minmin, Cairns Lynne S, Camilli Andrew (2017), "A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models", *Nature communications*. 8(1), tr. 14187.
158. Yoichi Masatoshi, Abe Michiharu, Miyanaga Kazuhiko, et al (2005), "Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect *Escherichia coli* O157: H7", *Journal of biotechnology*. 115(1), tr. 101-

107.

159. Zohra Tanzeel, Ikram Aamer, Salman Muhammad, et al (2021), "Wastewater based environmental surveillance of toxigenic *Vibrio cholerae* in Pakistan", *Plos one*. 16(9), tr. e0257414.
160. Nguyen Dong Tu, Ngo Tuan Cuong, Tran Huy Hoang, et al (2012), "Characterization of *Vibrio cholerae* O139 of an aquatic isolate in northern Vietnam", *The open microbiology journal*. 6, tr. 14.
161. World Health Organization *Disease Outbreak News*, truy cập ngày 16/10/2023, tại trang web <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON448>.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Các phương pháp phát hiện thực khuẩn thể tả

1. Phương pháp phân lập thực khuẩn thể tả từ mẫu nước

- Sử dụng mẫu nước (gồm mẫu nước bề mặt và mẫu môi gạc tôm) để phân lập thực khuẩn thể tả.

Mẫu gạc tôm

- Nguyên lý: dựa vào khả năng thích ứng của vi khuẩn tả có men chitinase có khả năng phân huỷ lớp vỏ chitin của các loài giáp xác trong đó có tôm chúng tôi tiến hành sử dụng gạc tôm làm môi để tăng khả năng tóm bắt vi khuẩn tả trong môi trường nước ngoài cảnh.

- Các mẫu gạc tôm được đặt qua đêm tại vị trí giám sát, sáng hôm sau thu thập vào ống pipet tôm kiềm.

- Ủ từ 6 – 8 h/37⁰C, sử dụng chloroform để giết vi khuẩn.

- Nhỏ lên đĩa thạch dinh dưỡng và nhỏ thực khuẩn thể tả chuẩn, đĩa thạch dinh dưỡng có lóng vi khuẩn chỉ điểm để tìm thực khuẩn thể tả.

Mẫu nước:

- Lấy 500ml nước bề mặt thu thập vào buổi sáng.

- Tăng sinh mẫu nước bằng pepton kiềm 10X, ủ qua đêm, sau đó được xử lý chloroform để giết vi khuẩn, nhỏ lên đĩa thạch dinh dưỡng có lóng vi khuẩn chỉ điểm để tìm thực khuẩn thể tả .

2. Phương pháp phân lập filamentous phage (thực khuẩn thể dạng sợi)

- Mẫu phân: lấy 1ml mẫu phân, ly tâm 15.000 vòng/5 phút/4⁰C.

- Từ dịch nổi nuôi cấy.

- Cách tiến hành:

+ Nuôi cấy các chủng tả trong 2-3ml của canh thang AT và nuôi cấy qua đêm 37°C.

+ Lấy 1ml dịch nuôi cấy qua đêm ly tâm 15.000 vòng/5 phút/4°C, giữ dịch nổi ở 4°C.

+ Chuẩn bị một chủng chỉ thị, là chủng Vibrio nào không tạo ra filamentous phage.

+ Nuôi cấy chủng này ở 37°C trong 4-5h lắc mạnh.

+ Pha loãng dịch nuôi cấy (canh khuẩn) khoảng 100 lần với canh thang AT.

+ Trộn 0,3 ml của canh thang (canh khuẩn) pha loãng với 3ml thạch mềm đổ lên đĩa thạch, đợi từ 10-15 phút cho đến khi thạch mềm cứng lại.

- Phát hiện filamentous phage.

+ Nhỏ 15 – 20µl dịch nuôi cấy hoặc dịch nổi của phần trên đĩa thạch vừa phủ thạch mềm.

+ Phân biệt các vết tan: Vết tan trong được hình thành bởi một số các thực khuẩn thể tả có dạng hình cầu; dạng vết tan đục được hình thành bởi các thực khuẩn thể tả dạng sợi.

3. Phương pháp xác định hình dạng thực khuẩn thể tả dưới kính KVĐT

- Mục đích : Để xác định hình dạng của thực khuẩn thể tả, so sánh với thực khuẩn thể tả chuẩn.

- Sau khi thực khuẩn thể tả được phân lập bằng phương pháp nuôi cấy. Gặt thực khuẩn thể tả vào nước muối sinh lý. Các mẫu được gắn lên lưới vàng, mặt trên lưới dùng để thấm mẫu, sau đó rửa qua nước cất 02 lần, thấm lên giấy thấm, nhuộm bằng Uranyl acetat 2% (pH = 4,5) trong nước cất 02 lần từ 1-2 phút, thấm lại trên giấy thấm mẫu, chuyển sang đĩa để đặt mẫu, để khô

trong 05 phút, đặt lên giá để soi dưới kính hiển vi điện tử.

4. Kỹ thuật PCR (*Polymerase Chain Reaction*): phản ứng chuỗi polymerase

Phản ứng PCR được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực công nghệ sinh học và y học trong đó có chẩn đoán bệnh tả; cung cấp một phương pháp chẩn đoán nhanh, có hiệu quả, khắc phục nhược điểm của phương pháp nuôi cấy. Kỹ thuật PCR cho phép xác định thực khuẩn thể tả trong mẫu nước nhờ khả năng sao chép khuếch đại số lượng đoạn trình tự ADN đặc hiệu trên genome của thực khuẩn thể tả .

Quá trình sao chép được thực hiện trong một chu trình nhiệt lặp lại nhiều lần với sự tham gia của enzym chịu nhiệt Tag polymeaza, deoxynucleotit triphosphat (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) và cặp mồi đặc hiệu cho đoạn trình tự sao chép.

Đoạn mồi là một nucleotit dài từ 6 đến 30 nucleotit có khả năng gắn với đoạn khuôn mẫu tại điểm khởi đầu và điểm kết thúc sao chép nhờ trình tự nucleotit bổ sung. ADN khuôn mẫu sẽ được biến tính ở nhiệt độ cao tạo điều kiện cho cặp đoạn mồi gắn vào hai chuỗi đơn tại điểm đầu và điểm cuối của trình tự khuôn mẫu. Dưới tác dụng của ADN polymeaza mỗi đoạn mồi được kéo dài, sợi ADN mới được bắt đầu tại mỗi đoạn mồi và kéo dài về phía đoạn mồi nằm trên sợi đối diện.

Như vậy, sau mỗi chu kỳ đoạn axit nucleic đích sẽ được nhân đôi, các sợi ADN mới được tổng hợp đều có chứa điểm bám cho các đoạn mồi, các sợi ADN mới này sau đó lại được sử dụng như đoạn khuôn mẫu cho những lần tổng hợp tiếp theo. Kết quả cuối cùng của phản ứng PCR là sau n chu kỳ, tính theo lý thuyết từ một đoạn khuôn mẫu sẽ có 2^n bản sao. Số bản sao từ một đoạn có thể lên tới hàng tỷ sau 30 đến 40 chu kỳ. Các bản sao này do có cùng kích thước phân tử và đủ lớn về mặt số lượng nên có thể phát hiện dễ dàng nhờ điện

di trên thạch agarose.

Trong cơ thể sinh vật, quá trình sao chép ADN dựa trên cơ sở mạch khuôn, khởi đầu bằng các trình tự mồi và được quyết định bởi tác động của enzyme ADN polymeraza. Bằng phản ứng PCR, khi cung cấp đủ DNA khuôn mẫu, mồi, ADN polymeraza và các thành phần bổ sung khác như: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dung dịch đệm cho phản ứng PCR, chúng ta có khuếch đại số lượng bản sao của các gen đặc hiệu O1, O139 và *ctxA*, *toxR* có liên quan đến vi khuẩn tả thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzyme Taq polymeraza và 4 cặp mồi đặc hiệu cho các đoạn ADN này. Mục đích của phản ứng là để phát hiện sự hiện diện của một hay nhiều gen đặc hiệu.

5. Kỹ thuật Southern blot

- Nguyên lý: Kỹ thuật Southern blot phân tích ADN của bộ gen của thực khuẩn thể tả. Sử dụng enzyme giới hạn, cắt ADN thành các đoạn nhỏ và điện di chúng trên thạch agarose. Thạch đã điện di được chuyển lên màng nitrocelluloza để phân biệt kích thước các đoạn gen hoặc so sánh ADN của các thực khuẩn thể tả khác nhau.

Phương pháp Southern blot sử dụng để xác định trình tự đặc hiệu của ADN. ADN mẫu được cắt bằng các loại enzyme giới hạn, sau đó được điện di trên thạch (agarose hoặc polyacrylamide), mẫu được biến tính và chuyển lên màng lai nitrocelluloza, để "lai" với các mẫu acid nucleic đã được đánh dấu (ADN có thể được đánh dấu bằng chất phóng xạ hoặc không).

Từ kết quả "lai" có thể xác định và phân lập được đoạn ADN mong muốn. Sau đó, đánh giá phân tích kết quả.

**Phụ lục 2 : Địa điểm lấy mẫu tại 04 tỉnh/thành phố
miền Bắc Việt Nam**

TT	Vị trí	Tỉnh/thành phố
1.	Sông Kim Ngưu (gần cầu Lạc Trung)	Hà Nội
2.	Sông Kim Ngưu (gần số 135 đường Tam Trinh)	
3.	Hồ Thanh Nhàn (đường Võ Thị Sáu)	
4.	Hồ Yên Sở (quận Hoàng Mai)	
5.	Sông Tô Lịch (khu vực Ngã tư Sở)	
6.	Hồ Linh Đàm (bán đảo Linh Đàm)	
7.	Sông Tô Lịch (khu vực Đại Kim)	
8.	Sông Tô Lịch (khu vực gần cầu Bưởi)	
9.	Sông Nhuệ (gần cầu Trắng)	
10.	Kênh nước (ngõ 632 đường Quang Trung, quận Hà Đông)	
1.	Kênh nước (gần TYT phường Hòa Nghĩa, quận Dương Kinh)	Hải Phòng
2.	Sông He (gần Nhà văn hóa phường Hòa Nghĩa, quận Dương Kinh)	
3.	Kênh nước (gần cổng làng phường Hòa Nghĩa, quận Dương Kinh)	
4.	Kênh nước (gần Nhà văn hóa Quý Kim, quận Đồ Sơn)	
5.	Kênh nước (gần đường Quý Kim, quận Đồ Sơn)	
6.	Kênh nước (gần cổng làng đường Quý Kim, quận Đồ Sơn)	
7.	Kênh nước (cửa sông Đáy, phường Hải Thành, quận Dương Kinh)	

TT	Vị trí	Tỉnh/thành phố
8.	Kênh nước phường Hải Thành (quận Dương Kinh)	
9.	Kênh nước (gần bãi rác quận Đồ Sơn)	
10.	Sông Lạch Hồng (quận Đồ Sơn)	
1.	Sông Lân (gần bệnh viện huyện Tiền Hải)	Thái Bình
2.	Kênh nước (giữa xã Tây Tiến, Tiền Hải)	
3.	Kênh nước (gần trường cấp 3 Tiền Hải)	
4.	Kênh 4 cống (xã Nam Hưng, Tiền Hải)	
5.	Kênh nước (gần bãi rác Nam Hưng, Tiền Hải)	
6.	Sông Ông Tiêu (Nam Hưng, Tiền Hải)	
7.	Kênh trạm xăng (Nam Phú, Tiền Hải)	
8.	Kênh gần bệnh nhân tả 1 (Nam Phú, Tiền Hải)	
9.	Kênh gần bệnh nhân tả 2 (Nam Phú, Tiền Hải)	
10.	Sông gần TYT xã Nam Phú, Tiền Hải	
1.	Kênh nước thôn 9 (Trực Thái, Trực Ninh)	Nam Định
2.	Kênh nước thôn 7 (Trực Thái, Trực Ninh)	
3.	Kênh nước (gần TYT xã Trực Thái, Trực Ninh)	
4.	Kênh nước thôn 3 (Trực Thái, Trực Ninh)	
5.	Kênh nước thôn 5 (Trực Thái, Trực Ninh)	
6.	Kênh nước kế chợ Trực Thái, Trực Ninh	
7.	Sông Bé (Trực Cường, Trực Ninh)	
8.	Sông Bé (Trực Phú, Trực Ninh)	
9.	Kênh Liễu Đề (1), Nghĩa Hưng	
10.	Kênh Liễu Đề (2), Nghĩa Hưng	

Phụ lục 3: Danh sách chủng thực khuẩn thể trong nghiên cứu (36 chủng)

STT	Mã số chủng	Địa điểm	Năm	Mã số nghiên cứu	Nguồn chủng
1	HPwh07.4.18	Hải Phòng	2018	VP01	Mục tiêu 1 của nghiên cứu
2	HPwh10.06.18	Hải Phòng	2018	VP02	
3	HPwh01.08.18	Hải Phòng	2018	VP03	
4	HPwh07.08.18	Hải Phòng	2018	VP04	
5	HPwh05.08.19	Hải Phòng	2019	VP05	
6	HPwh04.12.19	Hải Phòng	2019	VP06	Kho chủng: Phòng TNVKĐR, Viện VSĐT Trung ương
7	HPsh05.02.20	Hải Phòng	2020	VP07	
8	HPsh08.02.20	Hải Phòng	2020	VP08	
9	TBsh08.02.18	Thái Bình	2018	VP09	Mục tiêu 1 của nghiên cứu
10	TBwh04.04.18	Thái Bình	2018	VP10	
11	TBwh07.06.18	Thái Bình	2018	VP11	
12	TBwh02.08.18	Thái Bình	2018	VP12	
13	TBsh09.10.18	Thái Bình	2018	VP13	
14	14-9.09w/TB	Thái Bình	2009	VP14	Kho chủng: Phòng TNVKĐR, Viện VSĐT Trung ương
15	73-6.07sh/TB	Thái Bình	2007	VP15	
16	76-6.07sh/TB	Thái Bình	2007	VP16	
17	84-6.07sh/TB	Thái Bình	2007	VP17	
18	85-6.07sh/TB	Thái Bình	2007	VP18	
19	88-6.07w/HP	Hải Phòng	2007	VP19	
20	92-6.07w/HP	Hải Phòng	2007	VP20	
21	92-6.07sh/HP	Hải Phòng	2007	VP21	
22	107-6.07sh/HP	Hải Phòng	2007	VP22	
23	108-6.07sh/TB	Thái Bình	2007	VP23	
24	124-6.07sh/TB	Thái Bình	2007	VP24	
25	155-9.07sh/TB	Thái Bình	2007	VP25	
26	158-9.07sh/TB	Thái Bình	2007	VP26	
27	160-9.07w/TB	Thái Bình	2007	VP27	
28	165-9.07sh/TB	Thái Bình	2007	VP28	
29	43-5.08sh/TB	Thái Bình	2008	VP29	
30	47-5.08w/TB	Thái Bình	2008	VP30	
31	3-8.08sh/TB	Thái Bình	2008	VP31	
32	4-8.08sh/TB	Thái Bình	2008	VP32	
33	8-8.08sh/TB	Thái Bình	2008	VP33	
34	9-8.08sh/TB	Thái Bình	2008	VP34	
35	12-8.08sh/TB	Thái Bình	2008	VP35	
36	16-8.08sh/HP	Hải Phòng	2008	VP36	

Phụ lục 4: Kết quả thu thập các chủng vi khuẩn thử nghiệm (20 chủng)

STT	Mã số chủng	Loại chủng	Nguồn	Năm	Địa điểm	KQ Xác định chủng
1	Bgd17	Vi khuẩn tả O1, Cổ điển	Nhật Bản	1982	Bangladesh	(+)
2	Vc154	Vi khuẩn tả O1, Cổ điển	Nhật Bản	1962	Thái Lan	(+)
3	H218	Vi khuẩn tả O1, Cổ điển	Nhật Bản	1962	Thái Lan	(+)
4	K23	Vi khuẩn tả O1, El tor	Nhật Bản	1975	Kenya	(+)
5	A107	Vi khuẩn tả O1, El tor	Nhật Bản	1983	Kenya	(+)
6	Mak757	Vi khuẩn tả O1, El tor	Nhật Bản	1937	Indonesia	(+)
7	AI1837	Vi khuẩn tả O139, Bengal	Nhật Bản	1992	Bangladesh	(+)
8	AI1855	Vi khuẩn tả O139, Bengal	Nhật Bản	1992	Bangladesh	(+)
9	AI4450	Vi khuẩn tả O139, Bengal	Nhật Bản	1992	Bangladesh	(+)
10	VN048p/07	Vi khuẩn tả O1, El tor	Viện VSDTTW	2007	Hà Nội, Việt Nam	(+)
11	VN29/95	Vi khuẩn tả O1, El tor	Viện VSDTTW	1995	Hải Phòng, Việt Nam	(+)
12	VN293/03VN	Vi khuẩn tả O1, El tor	Viện VSDTTW	2003	Hải Phòng, Việt Nam	(+)
13	VN02P/10	Vi khuẩn tả O1, El tor	Viện VSDTTW	2010	Hà Nội, Việt Nam	(+)
14	F1 - BN tiêu chảy	<i>V. parahaemolyticus</i>	Viện VSDTTW	2018	Hải Dương, Việt Nam	(+)
15	ShTb2 – Đâm nuôi tôm	<i>V. parahaemolyticus</i>	Viện VSDTTW	2019	Thái Bình, Việt Nam	(+)
16	ATCC 17802	<i>V. parahaemolyticus</i>	Viện VSDTTW			(+)
17	ATCC 25922	<i>E. coli</i>	Viện VSDTTW			(+)
18	ATCC 12022	<i>Shigella flexneri</i> 2b	Viện VSDTTW			(+)
19	ATCC 13076	<i>Salmonella enteritidis</i>	Viện VSDTTW			(+)
20	ATCC 11632	<i>Staphylococcus aureus</i>	Viện VSDTTW			(+)

Phụ lục 5: Các kỹ thuật xét nghiệm áp dụng trong nghiên cứu

1. Phương pháp phân lập vi khuẩn tả từ mẫu nước

450ml mẫu nước thu thập được trộn đều với 50ml dung dịch APW (alkaline peptone water) 10X, điều chỉnh môi trường nuôi cấy ở điều kiện pH khoảng 8.5, sau đó được ủ ở 37⁰C trong 18-24 giờ để tăng sinh vi sinh vật. Sau tăng sinh, cấy chuyển mẫu trên sang môi trường phân lập chọn lọc TCBS (Thiosulfate citrate bile sucrose agar) ở pH 8.6, 37⁰C trong 24 giờ. Chọn các khuẩn lạc nghi ngờ vi khuẩn tả để xác định các đặc điểm hình thái, kiểm tra tính chất sinh hóa và làm phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu đa giá và đơn giá.

2. Kỹ thuật thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả ở điều kiện pha loãng mật độ khác nhau

- Chuẩn bị các thực khuẩn thể ở nồng độ khoảng 10⁹ PFU/ml.
- Chuẩn bị các mẫu vi khuẩn tả chuẩn ATCC ở OD600 = 0.8.
- Chuẩn bị các đĩa thạch LB agar và thạch mềm.
- Giữ đĩa thạch nền LB agar ở 37⁰C và thạch mềm ở 55⁰C.
- Pha loãng thực khuẩn thể ở các nồng độ 10⁻¹ đến 10⁻¹⁰
- Lấy 30μl canh khuẩn vi khuẩn tả (OD600 = 0.8) trộn với 3ml thạch mềm giữ ở 55⁰C và láng đều lên mặt đĩa thạch LB agar.
- Giữ đĩa thạch trên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 10 phút => nhỏ 10μl dung dịch phage đã pha loãng vào đĩa thạch trên.
- Giữ đĩa thạch trên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 30 phút, sau đó đem ủ ở 37⁰C/24h.
- Đọc kết quả: Tìm các vết tan/Plaque tại các vị trí nhỏ dung dịch phage.

3. Kỹ thuật thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả ở điều kiện pH môi trường thử nghiệm khác nhau

- Chuẩn bị các thực khuẩn thể ở nồng độ khoảng 10⁹PFU/ml.

- Chuẩn bị các mẫu vi khuẩn tả chuẩn ATCC ở OD600 = 0.8.
- Chuẩn bị các dung dịch phage ở các điều kiện pH 4,0 đến pH 10. Giữ các dung dịch phage ở 25⁰C trong 24h trước khi tiến hành nhỏ đĩa.
- Giữ đĩa thạch nền LB agar ở 37⁰C và thạch mềm ở 55⁰C.
- Lấy 30μl canh khuẩn vi khuẩn tả (OD600 = 0.8) trộn với 3ml thạch mềm giữ ở 55⁰C và láng đều lên mặt đĩa thạch LB agar.
- Giữ đĩa thạch trên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 10 phút => nhỏ 10μl dung dịch phage vào các đĩa thạch trên.
- Giữ đĩa thạch trên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 30 phút, sau đó đem ủ ở 37⁰C/24h.
- Đọc kết quả: Tìm các vết tan/Plaque tại các vị trí nhỏ dung dịch phage.

4. Kỹ thuật thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả ở điều kiện nhiệt độ môi trường thử nghiệm khác nhau

- Chuẩn bị các thực khuẩn thể ở nồng độ khoảng 10⁹ PFU/ml, pH 7.0.
- Chuẩn bị các dung dịch thực khuẩn thể tả/phage và dung dịch đối chứng PBS ở các điều kiện nhiệt độ: (4⁰C, 15⁰C, 25⁰C, 30⁰C, 37⁰C, 41⁰C, 45⁰C, 55⁰C) và dung dịch PBS .
- Chuẩn bị các mẫu vi khuẩn tả chuẩn ATCC ở OD600 = 0.8.
- Trộn 0,5 ml canh khuẩn tả OD600=0.8 với 0,5ml dung dịch phage đã giữ ở các điều kiện nhiệt độ trên với (4⁰C, 15⁰C, 25⁰C, 30⁰C, 37⁰C, 41⁰C, 45⁰C, 55⁰C) và ủ 2h.
- Lọc qua fil lọc 0,22um (hãng Sartorius).
- Chuẩn bị các đĩa thạch LB agar và thạch mềm.
- Giữ đĩa thạch nền LB agar ở 37⁰C và thạch mềm ở 55⁰C.
- Lấy 30μl canh khuẩn vi khuẩn tả (OD600 = 0.8) trộn với 3ml thạch mềm giữ ở 55⁰C và láng đều lên mặt đĩa thạch LB agar.

- Giữ đĩa thạch trên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 10 phút => nhỏ 10µl dung dịch phage pha loãng ở các giải mật độ từ 10^{-1} đến 10^{-10} vào các đĩa thạch trên.
- Giữ đĩa thạch trên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 30 phút, sau đó đem ủ ở $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$.
- Đọc kết quả: Tìm các vết tan/Plaque tại các vị trí nhỏ dung dịch phage.
- Kết quả được đánh giá là 0 khi tại các mốc pha loãng vết tan/ Plaque của mẫu thử nghiệm và dung dịch phage gốc ban đầu tương đồng.
- Kết quả được đánh giá là 1+ khi tại mốc pha loãng sau mốc được đánh giá là 0 một bậc, số các vết tan/Plaque tại vị trí nhỏ mẫu <10 vết tan/plaque.
- Kết quả được đánh giá là 2+ khi tại mốc pha loãng sau mốc được đánh giá là 0 một bậc, số các vết tan/ Plaque tại vị trí nhỏ mẫu > 10 vết tan/plaque. Các vết tan còn rõ các ranh giới.
- Kết quả được đánh giá là 3+ khi tại mốc pha loãng sau mốc được đánh giá là 0 một bậc, số các vết tan/Plaque tại vị trí nhỏ mẫu > 10 vết tan/plaque. Các vết tan không rõ các ranh giới.

Pha loãng	Chúng	Mẫu 0	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
10^{-1}	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+
10^{-7}	+	+	+	+	+
10^{-8}	-	-	+	+	+
Đánh giá		0	1+ <10VT	2+ >10VT	3+ >10VT

5. Kỹ thuật thử nghiệm thời gian tồn tại của các thực khuẩn thể tả ở điều kiện môi trường nước ngoại cảnh khác nhau

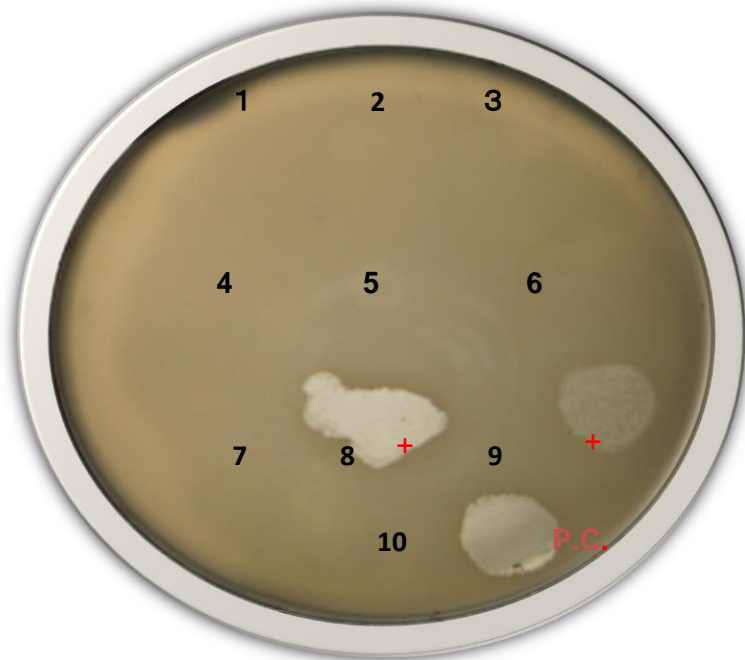
- Thu thập các loại mẫu nước Sông, nước Ao/Hồ, nước Máy, nước Giếng, nước Mưa ở các tỉnh/thành phố Hà Nội, Thái Bình, Nam Định và Hải Phòng.
- Chuẩn bị dung dịch thực khuẩn thể ở mật độ 10^{12}
- Trộn dung dịch thực khuẩn thể với mỗi loại nước thu thập và điều chỉnh mật độ ở khoảng 10^9 PFU/ml.
- Tiến hành lấy mẫu thử nghiệm khả năng tồn tại của thực khuẩn thể tả trong mẫu trộn trên ở các mốc thời gian: 0 (tại thời điểm trộn mẫu), 1 tuần, 2 tuần, 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng.
- Chuẩn bị các mẫu vi khuẩn tả chỉ thị ở $OD_{600} = 0.8$.
- Chuẩn bị các đĩa thạch LB agar (ủ ấm $37^{\circ}C/10-15'$) và 3ml thạch mềm giữ ở $55^{\circ}C$.
- Lấy 30 μ l canh khuẩn vi khuẩn tả chỉ thị ở nồng độ khoảng 10^{6-8} CFU/ml, 30 μ l dung dịch mẫu (pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-5}), trộn đều với 3ml thạch mềm giữ ở $55^{\circ}C$ và láng đều lên mặt đĩa thạch LB agar.
- Chờ khoảng 10 phút cho mặt thạch đông lại rồi, sau đó đem ủ ở $37^{\circ}C/24h$.
- Đọc kết quả: đếm số lượng các vết tan/Plaque trên các đĩa thạch.

6. Kỹ thuật thử nghiệm khả năng ly giải của các thực khuẩn thể tả ở điều kiện thời gian tồn tại và môi trường nước ngoại cảnh khác nhau

- Thu thập các loại mẫu nước Sông, nước Ao/Hồ, nước Máy, nước Giếng, nước Mưa ở các tỉnh/thành phố Hà Nội, Thái Bình, Nam Định và Hải Phòng.
- Chuẩn bị dung dịch thực khuẩn thể ở mật độ 10^{12}
- Trộn dung dịch thực khuẩn thể với mỗi loại nước thu thập và điều chỉnh mật độ ở khoảng 10^9 PFU/ml.

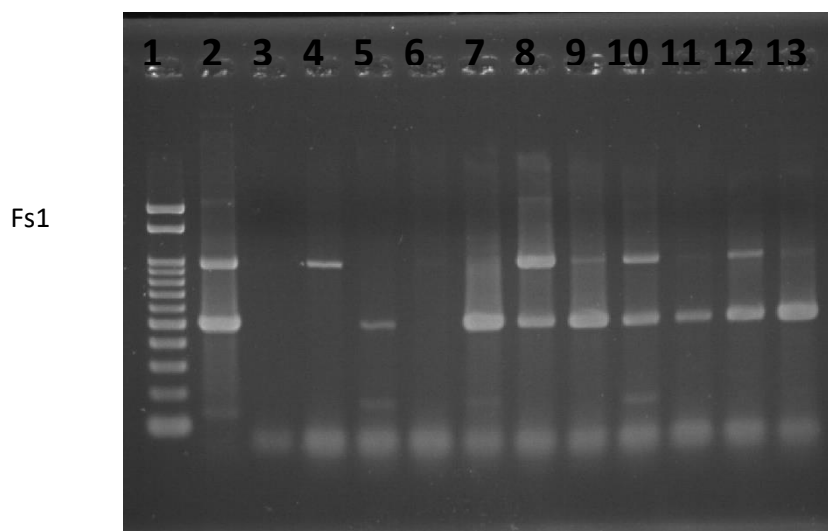
- Tiến hành lấy mẫu thử nghiệm khả năng tồn tại của thực khuẩn thể tả trong mẫu trộn trên ở các mốc thời gian: 0 (tại thời điểm trộn mẫu), 1 tuần, 2 tuần, 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng.
- Chuẩn bị các mẫu vi khuẩn tả chỉ thị ở OD600 = 0.8.
- Chuẩn bị các đĩa thạch LB agar (ủ ấm 37°C/10-15') và 3ml thạch mềm giữ ở 55°C.
- Lấy 30µl canh khuẩn vi khuẩn tả chỉ thị ở nồng độ khoảng 10⁶⁻⁸ CFU/ml, trộn đều với 3ml thạch mềm giữ ở 55°C và láng đều lên mặt đĩa thạch LB agar.
- Giữ đĩa thạch trên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 10 phút => nhỏ 10µl dung dịch mẫu ở các mốc thời gian trên vào các đĩa thạch trên.
- Giữ đĩa thạch trên ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 30 phút, sau đó đem ủ ở 37°C/24h.
- Đọc kết quả: Tìm các vết tan/Plaque tại các vị trí nhỏ dung dịch phage.

**Phụ lục 6: Hình ảnh vết tan/Plaque trong nuôi cấy thực khuẩn thể tả
và xét nghiệm PCR**



Hình ảnh Plaque trong nuôi cấy thực khuẩn thể tả

P.C: Chứng dương; 1-10: Mẫu nước ngoại cảnh



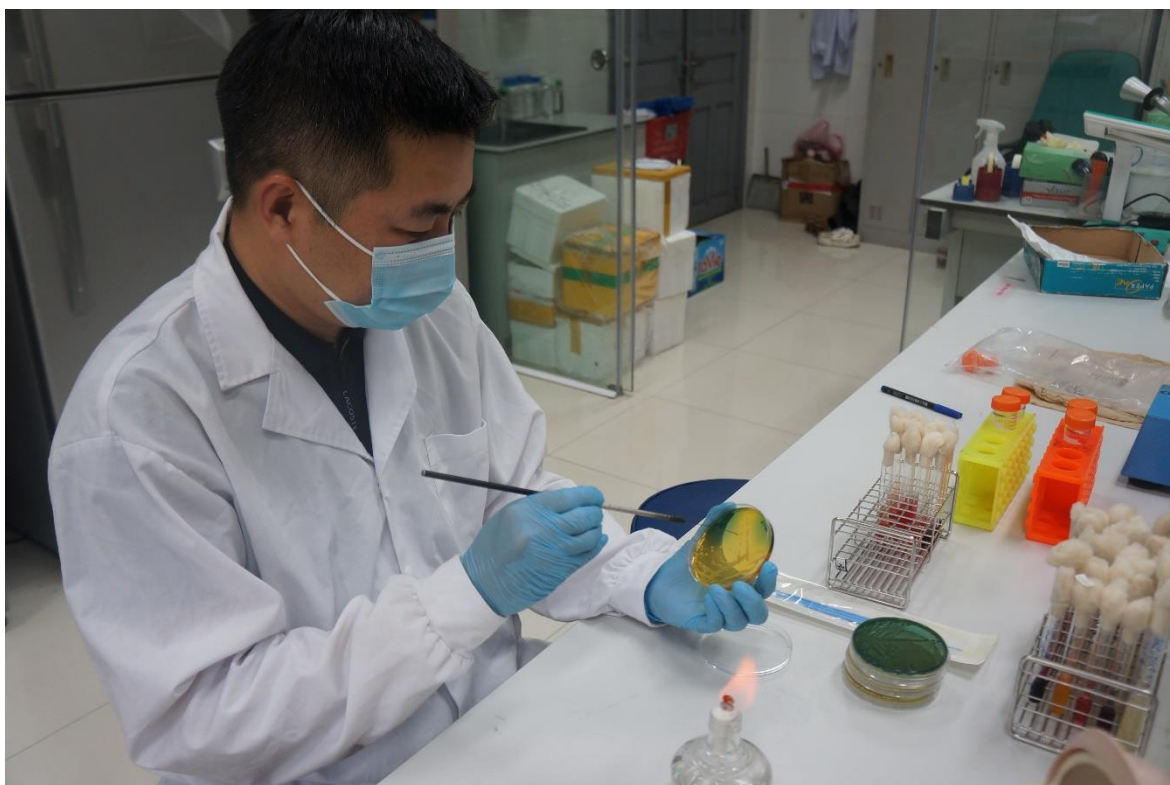
Hình ảnh PCR xét nghiệm mẫu nước ngoại cảnh

1: thang chuẩn 100bp; 2: chứng dương cho gen fs1 và fs2, 3: chứng âm; 4-13 là mẫu ngoại cảnh

Phụ lục 7: Một số hình ảnh thu thập mẫu nước ngoại cảnh



Phụ lục 8: Một số hình ảnh thực hành thí nghiệm



Phụ lục 9: SOP nuôi cấy vi khuẩn tả (kèm theo)

Phụ lục 10: SOP PCR xét nghiệm vi khuẩn tả, thực khuẩn thể (kèm theo)