

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM



NGUYỄN THỊ HẢI

**NGHIÊN CỨU TÍNH NHẠY CẢM  
KHÁNG SINH CỦA TRỰC KHUẨN MỦ XANH  
(*PSEUDOMONAS AERUGINOSA*)**

**Chuyên ngành: SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

**Mã số: 60 42 30**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: TS.BS. LƯU THỊ KIM THANH**

**THÁI NGUYÊN - 2010**

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Xã hội càng phát triển thì nhu cầu về chăm sóc và bảo vệ sức khỏe của con người ngày càng cao; có sức khỏe con người có thể làm ra nhiều của cải vật chất, nâng cao chất lượng cuộc sống. Vì vậy việc tìm hiểu, nghiên cứu các tác nhân gây bệnh và cách chữa trị cho con người là việc làm thiết thực có ý nghĩa quan trọng, góp phần vào sự phát triển chung của nhân loại.

Tồn tại xung quanh chúng ta có biết bao nhiêu tác nhân gây bệnh mà mắt thường không nhận biết được, trong đó có các vi sinh vật. Khi cơ thể suy yếu, sức đề kháng giảm, chúng ta đều có thể bị tấn công.

Hiện nay, nhờ sự phát triển mạnh mẽ của khoa học cũng như y học, người ta đã phân lập, phát hiện ra rất nhiều loại vi khuẩn có khả năng gây bệnh; đặc biệt là loại vi khuẩn gây nhiễm trùng cơ hội Trục khuẩn mũ xanh (tên khoa học là *Pseudomonas aeruginosa*) - một trong những tác nhân quan trọng gây nhiễm khuẩn bệnh viện.

Trục khuẩn mũ xanh là trục khuẩn Gram âm, chúng phân bố rộng rãi trong các môi trường ngoại cảnh như đất, nước, không khí, nhất là ở môi trường ẩm ướt chúng có nhiều cơ hội xâm nhập và gây bệnh. Nhiễm trùng do Trục khuẩn mũ xanh gây ra điển hình là nhiễm trùng da (nhiễm trùng vết thương, vết bỏng...), nhiễm trùng đường hô hấp (viêm phổi, viêm phế quản...), nhiễm trùng đường tiểu và nặng hơn là gây nhiễm trùng huyết. Nếu vi khuẩn xâm nhập vào các cơ quan thiết yếu của cơ thể như phổi, đường tiết niệu, và thận, sẽ gây ra những hậu quả chết người vì vi khuẩn này phát triển tốt trên các bề mặt bên trong cơ thể.

Trục khuẩn mũ xanh là loại vi khuẩn có khả năng kháng lại nhiều loại kháng sinh, việc sử dụng kháng sinh không đúng cách trong cộng đồng và chưa hợp lý trong bệnh viện đã đưa tới mức độ đề kháng kháng sinh của vi khuẩn nói chung và Trục khuẩn mũ xanh nói riêng ngày một tăng.

Sử dụng kháng sinh an toàn và hợp lý trên cơ sở hiểu biết những cơ chế tác dụng của kháng sinh cũng như đặc tính của vi khuẩn và mức độ nhạy cảm với kháng sinh của chúng đóng vai trò góp phần hết sức quan trọng trong việc điều trị bệnh cho bệnh nhân.

Trước yêu cầu của thực tiễn, chúng tôi tiến hành đề tài: “**Nghiên cứu tính nhạy cảm kháng sinh của Trực khuẩn mủ xanh (*Pseudomonas aeruginosa*)**” nhằm những mục tiêu nghiên cứu sau:

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

- Xác định tỷ lệ nhiễm trùng do Trực khuẩn mủ xanh trên bệnh nhân và tỉ lệ ô nhiễm Trực khuẩn mủ xanh ở môi trường bệnh viện.

- Định loại Trực khuẩn mủ xanh.

- Xác định mức độ đơn kháng và đa kháng kháng sinh của Trực khuẩn mủ xanh.

## **3. Nội dung nghiên cứu**

- Phân lập *P.aeruginosa* từ một số bệnh phẩm (mủ vết thương, dịch mũi họng, nước tiểu), từ môi trường (nước, không khí, bề mặt dụng cụ y tế đang sử dụng) trong bệnh viện.

- Nghiên cứu mức độ kháng kháng sinh của *P.aeruginosa* dựa trên kết quả kháng sinh đồ của các chủng *P.aeruginosa* phân lập được.

## CHƯƠNG 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Những nghiên cứu về *Pseudomonas aeruginosa*

##### 1.1.1. Lược sử nghiên cứu *P.aeruginosa*

Năm 1872, *P.aeruginosa* được Schroeter mô tả lần đầu tiên với tên gọi là *Bacterium aeruginosa* [8].

Ngay từ trước khi phân lập, đã có nhiều nhận xét cho rằng trong một số trường hợp vết thương sinh ra một loại mũ đặc biệt có màu xanh như màu rỉ đồng. Hiện tượng này được giải thích theo nhiều ý kiến khác nhau, nhưng lời giải thích thỏa đáng khi người ta phân lập được vi khuẩn từ ổ mũ thuần khiết.

Năm 1882, nhà khoa học đầu tiên nghiên cứu về *Bacterium aeruginosa* đó là dược sĩ Carle Gessard. Ông phân lập vi khuẩn này trên mũ vết thương và kết quả nghiên cứu đã tìm thấy đặc trưng của *Bacterium aeruginosa* là sinh sắc tố có màu xanh, tan trong nước. Từ đó người ta còn gọi vi khuẩn này là trực khuẩn mũ xanh [32].

Năm 1900, Migula đã nghiên cứu và phân loại vi khuẩn này vào chi *Pseudomonas*; từ đó vi khuẩn này mang tên *P.aeruginosa* [8].

Năm 2000, một nhóm các nhà khoa học đại học Washington và khoa sinh của trường đại học California, San Diego đã nghiên cứu và giải được trình tự genome của *P.aeruginosa* PA01 [33].

Năm năm sau đó, trình tự genome của PA14 cũng đã được tìm ra bởi các nhà khoa học thuộc trường Đại học Y Harvard [33].

Trong những năm gần đây, *P.aeruginosa* là một trong những căn nguyên gây bệnh rất phổ biến và kháng lại hầu hết các kháng sinh đang dùng. Vì vậy, nó thu hút rất nhiều đề tài nghiên cứu của các nhà khoa học và các y bác sĩ trong cũng như ngoài nước.

Nghiên cứu nhiễm khuẩn huyết bồng do *P.aeruginosa* gây ra tại Viện Bông Quốc gia (6/1996 - 12/1998) đã cho thấy *P.aeruginosa* là vi khuẩn gây nhiễm khuẩn huyết bồng hàng đầu (chiếm khoảng 66,7%) [10].

Năm 2002, Chu Anh Tuấn, Nguyễn Văn Huệ, Lê Đức Mẫn nghiên cứu căn nguyên gây nhiễm khuẩn huyết và yếu tố bệnh lý liên quan tại Viện Bông Quốc Gia đã cho thấy *P.aeruginosa* là căn nguyên gây nhiễm hàng đầu (74,3%) [24].

Năm 2003, theo kết quả giám sát của Bộ y tế về các vi khuẩn gây bệnh thường gặp ở Việt Nam thì *P.aeruginosa* là vi khuẩn đứng đầu trong số các vi khuẩn đó chiếm tỷ lệ 22,3% [11].

Hoàng Kim Tuyền và cộng sự nghiên cứu tình hình kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh phân lập tại bệnh viện Thống Nhất (8/2002 - 8/2005) đã chứng minh được *P.aeruginosa* là nguyên nhân hàng đầu gây viêm phổi tại bệnh viện với tỷ lệ kháng thuốc khá cao (>60%) [25].

Lê Thu Hồng, Hoàng Ngọc Hiện (bộ môn vi sinh - Học viện quân y) đã nghiên cứu chế tạo huyết thanh kháng *P.aeruginosa* đa giá, tinh chế và đánh giá hiệu quả điều trị tại chỗ của chế phẩm trên động vật và bệnh nhân bỏng [12].

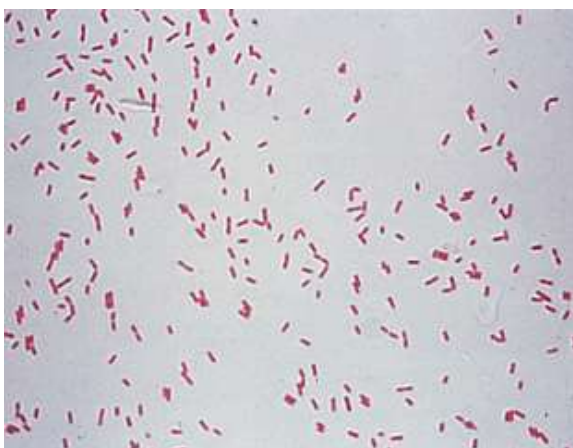
Theo một nguồn tin mới đây, một loại vaccine đường uống có thể bảo vệ cơ thể người kháng lại *P.aeruginosa* mang tên *Pseudostat - 1* đã được công bố bởi các nhà khoa học Anh và Úc vào tháng 6/2006. Đây là một loại vaccine sử dụng *P.aeruginosa* tinh chế đã bất hoạt [26].

Ngoài ra, còn rất nhiều nghiên cứu khác ở trong nước và trên thế giới đánh giá tình trạng nhiễm trùng và mức độ kháng thuốc của loài vi khuẩn này.

### **1.1.2. Đặc điểm sinh vật học của *P.aeruginosa***

#### **1.1.2.1. Hình thái, cấu tạo**

Là trực khuẩn gram âm, hình que, thẳng hoặc hơi cong nhưng không xoắn, hai đầu tròn, chiều dài 1 - 1,5 $\mu$ m, rộng 0,5 - 1 $\mu$ m, đứng một mình hay thành đôi hoặc kết hợp thành chuỗi ngắn. Trực khuẩn mũ xanh không sinh bào tử, có khả năng di động nhờ một tiêm mao đơn cực [32].



**Hình 1.1: *P.aeruginosa* soi trên kính hiển vi quang học**

### 1.1.2.2. Cấu trúc tế bào

#### ✦ Vỏ polysaccharide:

*P. aeruginosa* tiết ra chất nhầy có cấu tạo là *polysaccharide* gồm nhiều tiểu phần *mannuronic acid* và *glucuronic acid* hay còn được gọi là *alginate*. Các dạng *alginate* này kết hợp với nhau tạo thành dạng cấu trúc *biofilm* giúp bảo vệ che chở vi khuẩn tồn tại được trong môi trường tự nhiên cũng như tránh được hệ miễn dịch của cơ thể vật chủ. [34].

#### ✦ Màng sinh chất:

Hầu hết các chủng *P.aeruginosa* có khả năng tổng hợp một loại protein trên bề mặt màng sinh chất (pr F). Protein F vận chuyển có chọn lọc các chất qua lại màng trong giới hạn khoảng 500Da. Vì vậy, nó làm giảm tính thấm của màng, ngăn không cho các chất có hại đi vào bên trong tế bào giúp cho *P.aeruginosa* có khả năng đề kháng cao với nhiều loại kháng sinh [30].

#### ✦ Tiên mao:

*P.aeruginosa* có một tiên mao duy nhất ở một cực, tiên mao giúp cho vi khuẩn di động. Về cấu tạo hoá học, tiên mao được cấu tạo bởi các protein gọi là *Flagellin*. Các *Flagellin* mang tính chất kháng nguyên gọi là kháng nguyên lông H.

#### ✦ Tiêm mao:

- Là những sợi lông rất mảnh, dài khoảng 6nm, mọc quanh bề mặt tế bào.

Vai trò: Giúp cho vi khuẩn bám vào môi trường lỏng hay bề mặt biểu mô của tế bào vật chủ trong quá trình lây nhiễm.

#### ✦ Nhân:

Vật chất di truyền của *P.aeruginosa* là một phân tử DNA trần, dạng vòng tồn tại trong nguyên sinh chất. Kích thước DNA từ 5,2 - 7 triệu cặp base chứa khoảng 65% là (Guanine + Cytosine). Ngoài ra, *P.aeruginosa* cũng có chứa vật chất di truyền ngoài nhân đó là các plasmid. Các plasmid chứa các đoạn gen như TEM, OXA, PSE mã hóa sinh ra enzyme betalactamase làm phá huỷ vòng betalactam của chất kháng sinh dẫn tới *P.aeruginosa* kháng lại với hầu hết các kháng sinh thuộc nhóm này. Do vậy mà rất khó khăn trong việc lựa chọn thuốc điều trị nhiễm khuẩn do *P.aeruginosa* gây ra [35].

### 1.1.2.3. Phân bố

Trực khuẩn mũ xanh được tìm thấy ở rất nhiều nơi trong môi trường sống như: trong đất, nước, các bể bơi, hồ tắm nước nóng... nhưng phổ biến nhất là những nơi ẩm thấp. Ở người, chúng có thể sống ở vùng da ẩm như nách, háng và một số ít sống trong ruột. Ngoài ra, vi khuẩn này còn được phát hiện sống bám bên ngoài của thực vật, động vật, kể cả trong bệnh viện [28].

Ít khi có nhiễm trùng do *P.aeruginosa* ở người khỏe mạnh. Chúng là căn nguyên quan trọng nhất trong các nhiễm khuẩn ở bệnh nhân bị bệnh nặng như bệnh tăng bạch cầu, u xơ bàng quang và bệnh nhân có bóng rỗng. Trong điều kiện ướt, nước và nếu thêm yếu tố giàu chất khoáng, giàu dinh dưỡng thì rất thuận lợi cho sự tồn tại và phát triển của trực khuẩn *P.aeruginosa* (như dụng cụ làm ẩm oxy, ống hút, lavabo rửa tay, nước lưu cữ...). Vi khuẩn chứa trong các hạt khí dung khi được hít vào cơ thể thì có thể tránh được những cơ chế bảo vệ bình thường của đường hô hấp để gây ra nhiễm khuẩn. Có nhiễm khuẩn do *P.aeruginosa* sinh trưởng ngay trong các thuốc dùng cho điều trị. Thậm chí vi khuẩn này tồn tại được ngay cả trong một số chất tẩy uế. Bồn và các dụng cụ làm thông khí có thể ô nhiễm nặng và là nguồn gây nhiễm ra môi trường. Tuy nhiên, nguy cơ chính bị nhiễm khuẩn do *P.aeruginosa* là từ sự phơi nhiễm, tiếp xúc của các bộ phận miễn cảm với những dụng cụ, phương tiện... ô nhiễm vi khuẩn này [6].

Ở bệnh viện, trực khuẩn mũ xanh thường tìm thấy ở đầu các ống thông, máy khí dung, máy hô hấp nhân tạo, máy hút âm, bình chứa nước, thậm chí ở trong cả một số dung dịch sát khuẩn dùng để rửa vết thương.

### 1.1.2.4. Đặc điểm nuôi cấy

Trực khuẩn mũ xanh hiếu khí, mọc dễ dàng trên các môi trường nuôi cấy thông thường như thạch dinh dưỡng, thạch máu, canh thang nhưng thích hợp nhất là môi trường SS. Nhiệt độ thích hợp từ 30 - 37<sup>0</sup>C, PH = 4,5 - 9,0; tối ưu là 37<sup>0</sup>C, pH từ 7,2 - 7,5 [1].

Trên môi trường lỏng làm đục đều, trên bề mặt có váng. Trên môi trường đặc có hai loại khuẩn lạc: Khuẩn lạc S (tròn đều mặt nhẵn, trung tâm hơi lồi). Khuẩn lạc R (nhỏ, xù xì hoặc nhầy, lồi) (hình 1.2 phụ lục ảnh).

Tính chất đặc trưng của trực khuẩn mũ xanh là sinh sắc tố (hình 1.3 phụ lục ảnh) và chất thơm. Trên môi trường nuôi cấy có pepton, nó có thể tiết ra các loại sắc tố sau:

+ *Pyocyanin*: Là loại sắc tố phenazin có màu xanh lơ, tan trong nước và chlorofoc, khuếch tán ra môi trường nuôi cấy làm cho môi trường và khuẩn lạc có màu xanh. Sắc tố này sinh ra thuận lợi trong môi trường tiếp xúc nhiều với không khí. Chỉ có trực khuẩn mũ xanh sinh sắc tố *pyocyanin*. Đây là một đặc điểm quan trọng để phân biệt *P.aeruginosa* với các vi khuẩn khác.

+ *Pyoverdin*: Là loại sắc tố huỳnh quang, phát màu xanh khi chiếu tia cực tím có bước sóng 400nm, tan trong nước nhưng không tan trong chlorofoc. Ngoài trực khuẩn mũ xanh chỉ có một số loài *Pseudomonas* tạo sắc tố này.

+ *Pyorubrin*: Sắc tố màu hồng nhạt, chỉ 1% trực khuẩn mũ xanh sinh sắc tố này.

+ *Pyomelanin*: Sắc tố màu nâu đen, chỉ 1-2% số chủng trực khuẩn mũ xanh sinh sắc tố *Pyomelanin*.

Có khoảng 5-10% số chủng trực khuẩn mũ xanh không sinh sắc tố.

### **1.1.3. Một số tính chất sinh hóa cơ bản**

- Hiếu khí tuyệt đối, oxidase (+), lên men đường glucoza, không lên men đường lactose, xitrat simmons (+), mannit (+), idol (-), H<sub>2</sub>S (-), LDC (-), ODC (-), ADH (-).

### **1.1.4. Sức đề kháng**

Trực khuẩn mũ xanh có sức đề kháng cao với nhiều yếu tố ở ngoại cảnh, chúng có thể tồn tại được ngay cả trong một số chất tẩy uế. Trong số các vi khuẩn, Trực khuẩn mũ xanh có sức kháng lại mạnh nhất với các thuốc kháng sinh. Mức độ kháng thuốc này là do cấu trúc các lỗ porin của màng ngoài làm hạn chế các thuốc kháng sinh đi vào khoảng trống của màng bào tương hơn so với những vi khuẩn Gram âm khác[6].

### **1.1.5. Cấu trúc kháng nguyên**

Vi khuẩn có kháng nguyên H và kháng nguyên O chịu nhiệt.

- Kháng nguyên H: Là kháng nguyên lông của vi khuẩn. Kháng nguyên có đặc điểm: Không chịu được nhiệt, bị cồn 50% và các men tiêu protein phá hủy, chịu được tác động của focmol 0,5%.



- Kháng nguyên O: Là kháng nguyên thân, đã có đến 16 loại do đó dựa vào kháng nguyên O để phân chia *P.aeruginosa* thành 16 typ huyết thanh ký hiệu từ P1 đến P16. Kháng nguyên O có đặc điểm: Chịu được nhiệt, rất độc, kháng cồn, bị phá hủy bởi focmon 0,5%.

### **1.1.6. Độc tố**

Trong quá trình xâm nhập và gây bệnh *P.aeruginosa* tiết ra một số ngoại độc tố sau: [31].

+ *Exoenzyme S*: Chủ yếu được sinh ra khi vi khuẩn có mặt trong những mô bông, độc tố này tác động lên tế bào bạch cầu trung tính và gây độc cho tế bào vật chủ.

+ *Exotoxin A*: Phần lớn *P.aeruginosa* sinh ra độc tố này, độc tố A không bền nhiệt, chúng có vai trò làm kìm hãm sự tổng hợp protein và gây chết tế bào.

- *Heamolysin*: *P.aeruginosa* sinh ra 2 *heamolysins* đó là *phospholipit C* và *rhamnolipit*, chúng có vai trò phân hủy *lecithin* và *lipit* tạo ra các lỗ thủng trên màng tế bào làm tăng khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn vào trong tế bào vật chủ.

Ngoài ra, *Paeruginosa* tiết ra một số enzym ngoại bào có vai trò trong tính độc của vi khuẩn trong quá trình xâm nhiễm là *Elastase* và *Alkaline protease*. Các protein enzyme này phá hủy các phân tử protein của vật chủ một cách đặc hiệu gây nên những đặc tính lâm sàng riêng của bệnh.

+ *Các elastase (LasB elastase, LasA elastase)*: Phân cắt các protein của tế bào nhân chuẩn như *collagen*, *elatin* và hủy hoại cấu trúc protein của các tế bào này. Đồng thời nó cũng phá vỡ hệ thống miễn dịch đặc hiệu của cơ thể (IgG, IgA, bổ thể), các phân tử ngoại bào làm cho nhiễm trùng lan tỏa đến các khu vực xa hơn với các biểu hiện lâm sàng như viêm màng keratin, hoại tử tổ chức trong bông và tạo các xơ nang. Ngoài ra, *Elastase* còn dung giải *fibronectin* giúp cho vi khuẩn dễ dàng bám vào màng nhầy phổi. *Elastase* phá vỡ biểu mô và cản trở chức năng của các lông mao bên trong đường hô hấp [29].

+ *Alkalinne protease*: Can thiệp vào sự hình thành fibrin và phân giải fibrin. Đồng thời, *elastase* và *alkaline protease* phân hủy chất nền của giác mạc và những cấu trúc bảo vệ khác cấu tạo nên *fibrin* và *elastin*. Hai enzym này cũng được cho rằng gây ra sự bất hoạt đối với hai yếu tố quan trọng của hệ miễn dịch là *interferon gamma* (IFN) và TNF (*Tumor Necrosis Factor*) [32].

### 1.1.7. Khả năng gây bệnh của *P.aeruginosa*

Mặc dù *P.aeruginosa* là vi khuẩn gây bệnh cơ hội nhưng nó là vi khuẩn có độc lực đặc biệt. Khi tuyến phòng thủ đầu tiên (hàng rào bảo vệ không đặc hiệu ở da, niêm mạc) bị phá vỡ (như khi bị vết thương) hoặc vi khuẩn được đưa vào cơ thể tất qua hàng rào này (như theo dụng cụ nội soi hoặc ống thông khí quản...) thì gây ra nhiễm khuẩn. Đầu tiên vi khuẩn bám dính vào bề mặt tế bào biểu mô và giai đoạn này cần đến vai trò của *pili* và *polysaccharide* ngoại bào. Các chủng nhầy phân lập từ bệnh nhân bị xơ phế nang tạo ra các *polysaccharide* chứa nhiều vi khuẩn làm tăng sự kết dính của vi khuẩn với biểu mô đường hô hấp và giúp chúng kháng lại thực bào. Sau khi xâm nhập, sự bảo vệ dựa vào thực bào và vỏ nhầy do *polysaccharide* có đủ khả năng và đủ thời gian để sản xuất *collagenase*, *elastase*, *pyocyanin* và các sản phẩm khác để làm lan truyền và phá hủy tổ chức cục bộ. Ngoại độc tố A có thể là nhân tố góp phần quan trọng gây tổn thương tổ chức và tác dụng làm lan tỏa nhiễm khuẩn. Nghiên cứu in vitro gần đây đã cho thấy sắc tố *pyocyanin* ức chế sự sản sinh *superoxide* của bạch cầu đa nhân. Có thể các nhân tố này rất quan trọng làm thuận lợi cho việc hình thành, lan tỏa và kéo dài nhiễm khuẩn.[6]

Nhiễm trùng thường xảy ra ở những người mà cơ chế bảo vệ bị tổn thương như sử dụng corticoit hay kháng sinh dài ngày, bỏng nặng hoặc tiêm tĩnh mạch ma túy... Vị trí nhiễm trùng thông thường là đường tiêu và vết thương hở (nhất là vết bỏng). Tại chỗ xâm nhiễm chúng gây viêm có mủ màu xanh, ở những cơ thể suy giảm sức đề kháng chúng có thể xâm nhập vào sâu hơn bên trong cơ thể và gây viêm ở các phủ tạng như các nhiễm trùng nung mủ và những áp xe ở những phần khác nhau của cơ thể người. Những trường hợp viêm màng trong tim, viêm phổi, viêm màng não tuy hiếm nhưng cũng xảy ra hoặc gây bệnh toàn thân như nhiễm khuẩn huyết, nhiễm khuẩn ở trẻ mới sinh thường gây bệnh rất trầm trọng. Nhiễm khuẩn huyết thường gây chết ở những cơ thể suy nhược [29].

*P.aeruginosa* là tác nhân gây viêm tai ngoài, thường là những người hay đi bơi. Loài vi khuẩn này có thể xâm nhập vào mắt (qua chấn thương hoặc do đưa thuốc bị nhiễm khuẩn vào) gây viêm màng kết mạc mắt, viêm giác mạc mắt hoặc