

SỰ LƯU HÀNH TYPE HUYẾT THANH VI KHUẨN *VIBRIO CHOLERA* PHÂN LẬP TẠI TỈNH TRÀ VINH

Nguyễn Thị Đầu¹, Nguyễn Thùy Linh¹, Hồ Thị Việt Thu²

TÓM TẮT

Từ 25 chủng vi khuẩn thuộc *Vibrio cholerae* phân lập trong nghiên cứu trước đây đã được sử dụng để định danh loài bằng kỹ thuật PCR và các xét nghiệm sinh hóa (theo tiêu chuẩn ISO/TS 21872-1:2007). Kết quả định type huyết thanh học cho thấy có 6 chủng *V. cholerae* đều thuộc type O1, với 50% (3/6) dương tính với Inaba, 50% (3/6) dương tính với Ogawa. Không có chủng nào thuộc type O139.

Chỉ số bám dính vi khuẩn *V. cholerae* vào niêm mạc ruột đối với thỏ không uống vaccine phòng bệnh tả là $55,7 \pm 13,9$ và $59,3 \pm 4,2$; cao hơn so với thỏ có uống vaccine phòng bệnh tả ($12,4 \pm 0,6$ và $7,41 \pm 1,9$).

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy chủng vi khuẩn phân lập có kháng nguyên ngưng kết với type huyết thanh của vi khuẩn đã sử dụng để sản xuất vaccine phòng bệnh tả (moORCVAX) hiện có ở Việt Nam.

Từ khoá: *Vibrio*, *V. cholerae*, type huyết thanh.

Circulation of the serotype of *Vibrio cholerae* isolated in Tra Vinh

Nguyen Thi Dau, Nguyen Thuy Linh, Ho Thi Viet Thu

SUMMARY

From 25 *Vibrio cholerae* strains obtained in last study was conducted for serotyping by PCR and biochemical (ISO/TS 21872-1:2007). The serotyping results showed that there were six *Vibrio cholerae* strains belonged to biotype O1, with 50% (3/6) strains were positive with Inaba, and 50% (3/6) strains were positive with Ogawa. There was not strain belonged to biotype O139.

The adhesion indexes of *V. cholerae* strains were 55.7 ± 13.9 and 59.3 ± 4.2 in the intestinal mucosa of the rabbits were not orally administered with cholerae vaccine. These indexes were 12.4 ± 0.6 and 7.41 ± 1.9 , higher than those of rabbits administered with cholerae vaccine.

The studied result also showed that the isolated strain shared the same serum type with the bacteria strain that was used to produce cholerae vaccine (moORCVAX) which was available in Viet Nam.

Keywords: *Vibrio*, *V. cholerae*, serotype.

I. GIỚI THIỆU

Vibrio cholerae là vi khuẩn Gram âm gây bệnh tả ở người, thuộc chi *Vibrio*, lớp *Gammaproteobacteria*, có hai type sinh học

chính, là type sinh học cổ điển và type sinh học El Tor, và một số nhóm type huyết thanh khác. *V. cholerae* được phân loại căn cứ trên kháng nguyên O ở phần thân và các nhóm huyết thanh, đến nay người ta đã biết có ít nhất 200 nhóm huyết thanh (Kaper *et al.*, 1995). Trước năm 1992, nhóm O1 là nhóm huyết thanh duy

¹ Đại học Trà Vinh

² Đại học Cần Thơ

nhất gây ra dịch, từ năm 1992 về sau, một nhóm huyết thanh khác là O139 gây ra các đại dịch bùng phát tại Ấn Độ và Bangladesh. Hiện nay, 2 nhóm huyết thanh này là nguyên nhân gây bệnh tả lưu hành và phát thành dịch; những nhóm huyết thanh *V. cholerae* khác không gây thành dịch được gom chung lại thành nhóm *V. cholerae* non-O1 và non-O139.

Ngoài ra, *V. cholerae* O1 còn được phân ra thành 3 type huyết thanh, Ogawa, Inaba và Hikojima; type thứ 3 này ít gặp và cũng chưa được mô tả đầy đủ. Các type huyết thanh này được chia thành 3 loại kháng nguyên (KN): A, B và C. KN A cấu tạo từ 3-deoxy-L-glycerotetronic acid, còn KN B và C chưa rõ. Tại Việt Nam, từ 1979 đến 1981, các ca bệnh tả chủ yếu là do type sinh học El Tor, type huyết thanh Ogawa; từ 1982 đến 1990, tất cả các ca bệnh tả đều nhiễm type huyết thanh Inaba; nhưng trong những năm sau 1990, tất cả các ca đều do type huyết thanh Ogawa (Nguyen *et al.*, 2009).

Để tìm hiểu các type huyết thanh phổ biến gây bệnh tả tại đồng bằng sông Cửu Long, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu: "Sự lưu hành type huyết thanh vi khuẩn *Vibrio cholerae* phân lập tại tỉnh Trà Vinh".

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

- Kháng huyết thanh định type *V. cholerae*: Kháng huyết thanh Inaba, Ogawa và O139 (Viện Pasteur Tp. Hồ Chí Minh).

- Vi khuẩn: 25 chủng vi khuẩn thuộc *V. cholerae* đã phân lập được dùng thử nghiệm trên thỏ sau khi hoạt hoá trong 2 giờ và tăng sinh trong môi trường APW ở 35°C từ 18-24 giờ để có nồng độ vi khuẩn trong 1 ml tương đương 1×10^5 đến 5×10^7 CFU (Richardson, K, 1991).

- Vacxin tả uống (mORCVAX) điều chế từ các chủng vi khuẩn tả toàn tế bào chết, gồm type sinh học cổ điển và type sinh học El Tor và chủng vi khuẩn tả O139, có chứa những phần bằng nhau của các chủng Ogawa và Inaba của vi khuẩn tả *V. cholerae* (Công ty TNHH MTV Vacxin và Sinh phẩm số 1, Hà Nội).

- Động vật thí nghiệm: 24 thỏ trắng giống New Zealand, trọng lượng 2-2,5 kg/con.

2.2. Phương pháp thí nghiệm

2.2.1. Thử nghiệm trên thỏ

12 thỏ thí nghiệm được cho uống vacxin tả với liều 1,5 ml/con, lặp lại lần 2 vào ngày thứ 14. Sau 28 ngày uống vacxin, thực hiện mô khám.

12 thỏ không uống vacxin cũng có chế độ nuôi dưỡng như trên.

Tiêm các chủng vi khuẩn đã phân lập (N8, O3.2, O1.2, Ng3, 85V1 và 81V1) vào ruột thỏ không uống vacxin và thỏ đã uống vacxin như nhau, sau đó mô khám xác định tính đáp ứng miễn dịch của 2 lô thỏ trên. Thỏ được gây mê để phẫu thuật, ruột non được cột thành 4 đoạn, mỗi đoạn 10 cm, cách nhau 2 cm. Dùng kim tiêm 1 ml vi khuẩn (có chứa 1×10^5 - 5×10^7 CFU) vào trong lòng từng đoạn ruột, đóng xoang phúc mạc, kiểm tra chất lỏng các thời điểm 3, 6, 9, và 16 giờ sau khi tiêm.

2.2.2. Các chỉ tiêu theo dõi

(i) **Xác định type huyết thanh của *V. cholerae***: được thực hiện bằng phản ứng ngưng kết với 4 loại kháng huyết thanh: Chủng Ogawa, chủng Inaba, chủng O139 và chủng đa giá.

(ii) **Xác định tỷ lệ dịch lỏng (FA: Fluid accumulation)**: Tỷ lệ dịch lỏng tích tụ trong các đoạn ruột được xác định bằng số lượng dịch lỏng (ml)/chiều dài đoạn ruột của thỏ (cm).

(iii) **Sự bám dính vi khuẩn vào bề mặt đường ruột**: Cắt từng đoạn ruột, cạo niêm mạc ruột hoặc dịch lỏng trong lòng ruột, sau đó pha loãng chất lỏng theo dãy thập phân (log 10). Kết quả được tính theo công thức: $Mi (CFU/ml) = Ai \times D1/v$ (Mi: số lượng vi khuẩn trong dung dịch ban đầu; Ai: số khuẩn lạc trung bình/đĩa; D1: độ pha loãng; v: dung tích huyền dịch /đĩa). Chuẩn bị các chuỗi pha loãng:

Phần trăm (%) bám dính = $100 \times \text{số vi khuẩn bề mặt ruột} / \text{số vi khuẩn bề mặt ruột} + \text{CFU dịch lỏng}$ (Richardson, K, 1991).

2.2.3. Xử lý số liệu

Phần mềm Minitab version 16.0: phân tích các giá trị FA và CFU (bảng 3, 4 và 5).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả định type huyết thanh

Kết quả định type huyết thanh học được thực hiện sau khi có kết quả định danh các loài thuộc *Vibrio* spp.

Bảng 1. Kết quả định type huyết thanh (n = 25)

Type huyết thanh	Dương tính	Tỷ lệ (%)
Inaba + Ogawa + O139 (đa giá)	6	24,0
Ogawa	3	12,0
Inaba	3	12,0
Chủng chưa xác định	19	76,0

Trong 25 chủng phân lập được có 6 chủng (24%) dương tính với kháng huyết thanh đa giá (O139, Ogawa, Inaba), 3 chủng (12%) dương tính với kháng huyết thanh đơn giá Ogawa và 3 chủng (12%) dương tính với kháng huyết thanh đơn giá Inaba. Ngoài ra, có 19 chủng (76%) chưa xác định được type huyết thanh học.

Những chủng vi khuẩn còn lại (19 chủng) không ngưng kết với kháng huyết thanh trên có thể thuộc nhóm non-O1 hoặc non-O139. Theo Garg *et al.* (2003), *V. cholerae* nằm trong nhóm các vi sinh vật thuộc hệ sinh thái là môi trường nước, các chủng thuộc O1 và O139 được phân lập ít so với các chủng non-O1 và non-O139 là những nhóm kháng huyết thanh không ngưng kết (NAG: nonagglutinable). Những chủng *V. cholerae* không ngưng kết với kháng huyết thanh O1 nhưng vẫn gây bệnh và có triệu chứng tiêu chảy trên người (Nicholas *et al.*, 2000).

Ở miền Bắc Việt Nam, trong ba đợt bùng phát dịch tả giữa tháng 11 năm 2007 và tháng 2 năm 2008, tất cả 70 mẫu phân lập từ mẫu phân bệnh nhân và nước sông được xác định thuộc *V. cholerae* O1 type huyết thanh Ogawa với các phương pháp kiểm tra đặc tính sinh hoá và phản ứng ngưng kết huyết thanh học (Binh Minh Nguyen *et al.*, 2009).

Binh Minh Nguyen *et al.* (2009) cũng

chứng minh rằng các type huyết thanh Ogawa và Inaba từ những chủng phân lập tại Việt Nam cũng bắt nguồn từ các nước lân cận có đại dịch xảy ra như Lào (2007 - 2008) và Campuchia (2010). Những chủng phân lập ngoài môi trường cũng như từ triệu chứng lâm sàng chỉ dương tính với kháng huyết thanh O1, chưa phát hiện chủng O139. Tất cả những chủng phân lập ngoài môi trường và phân bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng từ năm 2003 đến 2004 đều thuộc type huyết thanh Inaba, nhưng từ năm 2007 đến 2011, những chủng phân lập từ triệu chứng lâm sàng đều thuộc type huyết thanh Ogawa, và ngược lại, những chủng phân lập từ môi trường nước năm 2010 đều thuộc type huyết thanh Inaba.

Như vậy, các type huyết thanh trong nghiên cứu này là Ogawa và Inaba đều là những type đang phổ biến và hiện diện cả trong môi trường nước và trong thức ăn có nguồn gốc thủy hải sản.

3.2. Thử nghiệm độc lực chủng *V. cholerae* và đánh giá đáp ứng miễn dịch trên thỏ

3.2.1. Đối với thỏ không uống vắc xin phòng bệnh tả

Lượng dịch lỏng FA (Fluid accumulation): Sau khi đưa 1ml huyền dịch vi khuẩn vào ruột non thỏ có chứa 10^7 vi khuẩn *V. cholerae*, lượng dịch lỏng thu hồi được được thể hiện qua bảng sau:

Bảng 2. Lượng dịch lỏng (ml/cm) thu hồi trong ruột non của thỏ sau khi tiêm vi khuẩn theo thời gian

TT	Chủng VK	3 giờ	6 giờ	9 giờ	16 giờ	Số thỏ
1	N8	0,88	0,9	0,3	0,2	2
2	O3.2	0,7	0,8	0,4	0,2	2
3	O1.2	0,5	0,7	1,2	1,5	2
4	Ng3	0,5	0,6	0,8	1,7	2
5	85V1	0,7	0,8	1	1,6	2
6	81V1	0,7	0,9	1,2	1,8	2

Kết quả trên cho thấy khi tiêm vi khuẩn vào ruột non thỏ chưa uống vaccin sẽ kích thích niêm mạc ruột non thỏ tiết một lượng lớn dịch lỏng từ 0,7 - 0,9 ml/cm tại thời điểm 3 và 6 giờ, sau đó giảm dần chỉ còn 0,2 - 1,8 ml/cm ở thời điểm 16 giờ, do niêm mạc ruột không tiết kháng thể nên không gắn với thụ thể trên bề mặt vi

khuẩn (Taylor *et al.*, 1987).

Số lượng vi khuẩn *V. cholerae* bám dính trên niêm mạc ruột

Số lượng vi khuẩn đếm được tại các thời điểm 3 giờ, 6 giờ, 9 giờ và 16 giờ sau nuôi cấy được tổng hợp qua bảng 3.

Bảng 3. Số lượng vi khuẩn *V. cholerae* bám dính trên niêm mạc ruột non thỏ không uống vaccin

TT	Chủng VK	3 giờ	6 giờ	9 giờ	16 giờ	% bám dính		Số thỏ
						9 giờ	16 giờ	
1	N8	0	$6,5 \times 10^5$	4×10^5	0	$55,7 \pm 13,9$	0	2
2	O3.2	0	5×10^5	35×10^4	0	$59,3 \pm 4,2$	0	2
3	O1.2	0	12×10^5	$15,5 \times 10^4$	10×10^5	$81,2 \pm 6,5$	$52,6 \pm 5,3$	2
4	Ng3	0	13×10^5	$16,5 \times 10^5$	$9,8 \times 10^5$	$89,9 \pm 3,8$	$76,2 \pm 4,8$	2
5	85V1	0	$15,6 \times 10^5$	16×10^5	12×10^5	$77,5 \pm 2,4$	$79,9 \pm 8,9$	2
6	81V1	0	$16,5 \times 10^5$	$18,2 \times 10^5$	2×10^6	$75,4 \pm 1,7$	$79,1 \pm 7,2$	2

Theo bảng 3, số vi khuẩn bám dính trên niêm mạc ruột non tăng dần tại thời điểm 6 giờ và cao nhất tại thời điểm 9 giờ ở 4 chủng, sau đó có 2 chủng giảm dần và 2 chủng có ít vi khuẩn bám dính nhất tại thời điểm 16 giờ. Riêng 2 chủng N8 và O3.2, số lượng vi khuẩn chỉ bám dính tạm thời ở thời điểm 6 giờ từ 5×10^5 đến $6,5 \times 10^5$, sau đó giảm xuống đáng kể ở thời điểm 9 giờ chỉ còn 4×10^5 đến 35×10^4 và đến thời điểm 16 giờ, không còn *V. cholerae* bám dính.

3.2.2. Đối với thỏ có uống vaccin phòng bệnh tả

Lượng dịch lỏng FA (Fluid accumulation):
Sau khi đưa 1ml huyền dịch vi khuẩn vào ruột non thỏ có chứa 10^7 vi khuẩn *V. cholerae*, lượng dịch lỏng được thu hồi thể hiện qua bảng 4.

Qua kết quả trên, nhận thấy tất cả các chủng *V. cholerae* N8, O3.2, O1.2, Ng3, 85V1, và 81V1 khi tiêm vào ruột non đối với thỏ đã uống vaccin (mORCVAX) có tích lũy dịch lỏng tại thời điểm 3 giờ, 6 giờ, nhưng sau đó giảm dần, đến thời điểm 9 giờ và 16 giờ, số lượng dịch

Bảng 4. Lượng dịch lỏng (ml/cm) thu hồi trong ruột non của thỏ sau khi tiêm vi khuẩn theo thời gian

TT	Chủng VK	3 giờ	6 giờ	9 giờ	16 giờ	Số thỏ
1	N8	0,30	0,35	0,25	0,00	2
2	O3.2	0,40	0,25	0,20	0,00	2
3	O1.2	0,50	0,60	0,30	0,20	2
4	Ng3	0,50	0,60	0,40	0,25	2
5	85V1	0,40	0,50	0,30	0,15	2
6	81V1	0,40	0,40	0,30	0,20	2

lỏng còn không đáng kể, do niêm mạc ruột có tiết kháng thể gắn với thụ thể trên bề mặt vi khuẩn, cản trở vi khuẩn bám vào niêm mạc ruột của vật chủ, từ đó vi khuẩn không thể tiết ra độc tố và tế bào biểu mô ruột non không thể tiết ra chất lỏng (Taylor *et al.*, 1987). Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy, tất cả thỏ có uống vaccin phòng

bệnh tả đã có kháng thể nên dịch lỏng không tiết ra ở ruột non.

Số lượng *V. cholerae* bám dính trên niêm mạc ruột non

Số lượng khuẩn lạc thu được qua các giai đoạn 3 giờ, 6 giờ, 9 giờ và 16 giờ sau khi tiêm vi khuẩn được tổng hợp qua bảng sau:

Bảng 5. Số lượng *V. cholerae* bám dính trên niêm mạc ruột non thỏ đã uống vaccin

TT	Chủng VK	3 giờ	6 giờ	9 giờ	16 giờ	% bám dính		Số thỏ
						9 giờ	16 giờ	
1	N8	0	10^5	12×10^3	0	$12,4 \pm 0,6$	0	2
2	O3.2	0	8×10^4	20×10^3	0	$7,41 \pm 1,9$	0	2
3	O1.2	0	$13,8 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	0	$15,19 \pm 6,54$	0	2
4	Ng3	0	$14,1 \times 10^4$	$8,2 \times 10^4$	0	$14,77 \pm 3,12$	0	2
5	85V1	0	$15,6 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$	0	$14,64 \pm 4,18$	0	2
6	81V1	0	14×10^4	$4,6 \times 10^4$	0	$19 \pm 2,9$	0	2

Kết quả bảng 5 cho thấy, số lượng vi khuẩn bám dính trên niêm mạc ruột non cao nhất tại thời điểm 6 giờ và sau đó giảm dần tại các thời điểm 9 giờ và 16 giờ ở tất cả các chủng vi khuẩn, đến thời điểm 16 giờ, hầu như tất cả các chủng đều không còn bám dính vào niêm mạc ruột non, chứng tỏ *V. cholerae* bị ức chế bởi các kháng thể được tiết ra từ niêm mạc ruột non. Việc hình thành đáp ứng miễn dịch trên thỏ có thể giải thích theo 2 cơ chế:

Thứ nhất, khi kháng thể tiết ra sẽ ngăn chặn

vi khuẩn bám vào niêm mạc bằng cách gắn vào bề mặt kháng nguyên (Finkelstein *et al.*, 1982) làm bất động vi khuẩn hoặc kết dính với vi khuẩn, làm chúng không thể di chuyển trên bề mặt biểu mô ruột (Schrank *et al.*, 1976). Trong trường hợp này, tác nhân gây bệnh sẽ bám dính kém và dễ dàng bị cuốn trôi khi nhu động ruột trở lại bình thường;

Thứ hai, đáp ứng miễn dịch dịch thể trong bệnh tả làm xuất hiện IgG trong máu và IgA được tiết ra ở niêm mạc ruột, các kháng thể này tiết ra

có tác dụng diệt khuẩn, ngăn cản vi khuẩn bám dính vào niêm mạc ruột, hoặc vi khuẩn bị ức chế và không nhân lên để bám vào niêm mạc ruột (William *et al.*, 1983). Ngoài ra, một yếu tố liên quan cần thiết để gắn vào niêm mạc ruột là khả năng di động của vi khuẩn, nếu vi khuẩn di động ít, yếu ớt hoặc có đột biến gen ảnh hưởng đến sự tổng hợp protein của roi (Jones và Freter, 1976).

Như vậy, tất cả thỏ có uống vaccin phòng bệnh tả với chủng huyết thanh đơn giá Inaba và Ogawa đã có kháng thể, nên hàm lượng vi khuẩn chỉ bám dính tạm thời ở thời điểm 6 giờ, sau đó không còn bám dính vào niêm mạc ruột non ở thời điểm 16 giờ sau khi tiêm vi khuẩn.

IV. KẾT LUẬN

- Kết quả định type huyết thanh học: có 6 chủng *V. cholerae* đều thuộc type O1, với 50% (3/6) dương tính với Inaba, 50% (3/6) dương tính Ogawa. Không có chủng nào thuộc type O139.

- Kết quả chỉ số bám dính vi khuẩn *V. cholerae* vào niêm mạc ruột đối với thỏ không uống vaccin phòng bệnh tả là $55,7 \pm 13,9$ và $59,3 \pm 4,2$, cao hơn đối với thỏ có uống vaccin phòng bệnh tả ($12,4 \pm 0,6$ và $7,41 \pm 1,9$). Thỏ có đáp ứng miễn dịch đối với vaccin có thành phần kháng nguyên tương đồng với các chủng vi khuẩn phân lập ở Trà Vinh nhóm huyết thanh O1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Binh Minh Nguyen, Je Hee Lee, Ngo Tuan Cuong, Seon Young Choi, Nguyen Tran Hien, Dang Duc Anh, Hye Ri Lee, M. Ansaruzzaman, Hubert P. Endtz, Jongsik Chun, Anna Lena Lopez, Cecil Czerkinsky, John D. Clemens, and Dong Wook Kim, 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. *J. Clin. Microbiol*, 47(5): 1568–1571.
2. Finkelstein, R. A., and L. F. Hanne, 1982. Purification and characterization of the soluble hemagglutinin (cholera lectin) produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun*, 36:1199-1208.
3. Garg P, Nandy RK, Chaudhry P, Chaudhry NR, De K, Ramamurthy T, 2003. Emergence of *V. cholerae* O1 biotype El Tor serotype Inaba from prevailing O1 ogawa serotype strains in India. *J. Clin.*

Microbiol, 38(11): 4249-4253.

4. Jones, G. W., and R. Freter, 1976. Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: nature of the interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes. *Infect. Immun*, 14:240-245.
5. Kaper, J.B., Morris, J. G., Jr and Levine, M. M, 1995. Cholera. *Clin. Microbiol Rev*, 8: 48-86.
6. Nguyen, B. M., Lee, J. H., Cuong, N. T., Choi, S. Y., Hien, N. T., Anh, D. D., Lee, H. R., Ansaruzzaman, M., Endtz, H. P. and other authors, 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. *J. Clin. Microbiol*, 47 1568-1571.
7. Nicholas A. Daniels, MD, MPH, Alireza Shafaie, MD, 2000. A Review of Pathogenic *Vibrio* Infections for Clinicians. *Infect. Med*, 17(10): 665-685
8. Richardson, K, 1991. Roles of Motility and Flagellar Structure in Pathogenicity of *Vibrio cholerae*: Analysis of Motility Mutants in Three Animal Models. *Infect. Immun*, 59(8): 2727-2736.
9. Taylor, R. K., Miller, V. L., Furlong, D. B. and Mekalanos, J. J, 1987. Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 2833–2837.
10. Schrank, G. D., and W. F. Verwey, 1976. Distribution of cholera organisms in experimental *Vibrio cholerae* infections: proposed mechanisms of pathogenesis and antibacterial immunity. *Infect. Immun*. 13:195-203.
11. William C. Cray, Jr., Eiji Tokunaga, and Nathaniel F. Pierce, 1983. Successful Colonization and Immunization of Adult Rabbits by Oral Inoculation with *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun*, 41(2):735-741.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing .
13. Iso/TS-1:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.

Ngày nhận 17-6-2019

Ngày phản biện 3-7-2019

Ngày đăng 1-9-2019