

**BỘ Y TẾ**

**HƯỚNG DẪN  
THỰC HÀNH KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM  
VI SINH LÂM SÀNG**

*(Ban hành kèm theo Quyết định số 1539/QĐ-BYT  
ngày 20/4/2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế)*

**NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC  
HÀ NỘI – 2017**



**BỘ Y TẾ**

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**

**Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**

Số: **1539**/QĐ-BYT

Hà Nội, ngày **20** tháng **4** năm 2017

**QUYẾT ĐỊNH**  
**Về việc ban hành tài liệu chuyên môn**  
**“Hướng dẫn thực hành kỹ thuật vi sinh lâm sàng”**

**BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ**

Căn cứ Luật Khám bệnh, chữa bệnh năm 2009;

Căn cứ Nghị định số 63/2012/NĐ-CP ngày 31 tháng 8 năm 2012 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Y tế;

Theo đề nghị của Cục trưởng Cục Quản lý khám, chữa bệnh,

**QUYẾT ĐỊNH:**

**Điều 1.** Ban hành kèm theo Quyết định này tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn thực hành kỹ thuật vi sinh lâm sàng”.

**Điều 2.** Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn thực hành kỹ thuật vi sinh lâm sàng” được áp dụng tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trong cả nước.

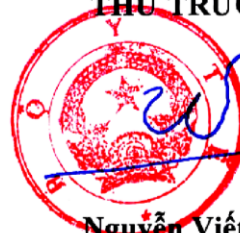
**Điều 3.** Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày ký, ban hành.

**Điều 4.** Các ông, bà: Chánh Văn phòng Bộ, Chánh thanh tra Bộ, Tổng Cục trưởng, Cục trưởng và Vụ trưởng các Tổng cục, Cục, Vụ thuộc Bộ Y tế, Giám đốc Sở Y tế các tỉnh, thành phố trực thuộc trung ương, Giám đốc các Bệnh viện, Viện trực thuộc Bộ Y tế, Thủ trưởng Y tế các ngành chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

**Nơi nhận:**

- Như Điều 5;
- Bộ trưởng (để b/c);
- Các Thứ trưởng;
- Cổng thông tin điện tử Bộ Y tế; Website Cục KCB;
- Lưu: VT, KCB.

**KT. BỘ TRƯỞNG**  
**THỨ TRƯỞNG**



**Nguyễn Việt Tiên**

**BỘ Y TẾ**

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**

Số: 34/QĐ-BYT

Hà Nội, ngày 11 tháng 7 năm 2016

**QUYẾT ĐỊNH**

**Thành lập Ban Biên soạn tài liệu “Kỹ thuật vi sinh lâm sàng”**

**BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ**

Căn cứ Nghị định số 63/2012/NĐ-CP ngày 31 tháng 8 năm 2012 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Y tế;

Theo đề nghị của Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh - Bộ Y tế,

**QUYẾT ĐỊNH:**

**Điều 1.** Thành lập Ban Biên soạn tài liệu kỹ thuật vi sinh lâm sàng bao gồm các thành viên trong danh sách đính kèm.

**Điều 2.** Ban biên soạn tài liệu kỹ thuật vi sinh lâm sàng có nhiệm vụ:

1. Lập kế hoạch xây dựng tài liệu kỹ thuật vi sinh lâm sàng và báo cáo Bộ Y tế.
2. Lập kế hoạch triển khai biên soạn, xin ý kiến, hoàn thiện tài liệu và báo cáo, tư vấn cho Bộ trưởng Bộ Y tế xem xét, quyết định ban hành.

**Điều 3.** Kinh phí hoạt động lấy từ nguồn ngân sách nhà nước và các nguồn kinh phí hợp pháp khác.

**Điều 4.** Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày ký ban hành. Ban biên soạn sẽ tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

**Điều 5.** Các ông/bà: Chánh văn phòng Bộ, Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh, Thủ trưởng các đơn vị có liên quan và các ông, bà có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này.

**Nơi nhận:**

- Như Điều 5;
- Bộ trưởng (để b/c);
- Lưu: VT, KCB.

**KT. BỘ TRƯỞNG  
THỦ TRƯỞNG**  
  
**Nguyễn Việt Tiên**

Hà Nội, ngày 11 tháng 7 năm 2016

**DANH SÁCH****Ban Biên soạn tài liệu “Kỹ thuật vi sinh lâm sàng”**

(Ban hành kèm theo Quyết định số 441/QĐ-BYT ngày 11 tháng 7 năm 2016)

1	PGS.TS. Lương Ngọc Khuê	Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh	Trưởng ban
2	PGS. TS. Đoàn Mai Phương	Nguyên Trưởng khoa Vi sinh, Bệnh viện Bạch Mai	Phó Trưởng ban
3	PGS.TS. Nguyễn Vũ Trung	Phó Giám đốc Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương, Trưởng Bộ môn Vi sinh, Đại học Y Hà Nội	Phó Trưởng ban
4	ThS. Nguyễn Trọng Khoa	Phó Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh	Phó Trưởng ban thường trực
5	PGS. TS. Nguyễn Thị Vinh	Nguyên Trưởng bộ môn Vi sinh trường đại học Y Hà Nội	Ủy viên
6	TS. Phạm Hùng Vân	Bộ Môn Vi Sinh, Khoa Y, ĐHYD tp. HCM	Ủy viên
7	TS. Phạm Hồng Nhung	Phó TK Vi sinh, Bệnh viện Bạch Mai	Ủy viên
8	BSCKI. Trần Thị Thanh Nga	Nguyên Trưởng khoa Vi sinh bệnh viện Chợ Rẫy	Ủy viên
9	TS. Nguyễn Thị Nam Liên	TK Vi sinh, Bệnh viện đa khoa TŨ Huế	Ủy viên
10	TS. Nguyễn Văn Hưng	TK Vi sinh và labo Lao chuẩn quốc gia, bệnh viện bệnh Phổi TŨ	Ủy viên
11	TS. Hoàng Thu Hà	TK Vi khuẩn Viện Vệ sinh dịch tễ TŨ	Ủy viên
<b>Thư ký</b>			
12	ThS. Ngô Thị Bích Hà	PTP Nghiệp vụ Y và Dược bệnh viện, Cục QLKCB	Tổ trưởng
13	TS. Lê Thị Ánh Hồng	Nguyên Trưởng khoa Vi sinh BV Xanh Pôn	Thành viên
14	Ths.BS. Phạm Thái Bình	Giảng viên Bộ môn Xét nghiệm, Khoa Điều dưỡng và KTYH, Trường Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh	Thành viên

**KT. BỘ TRƯỞNG  
THỦ TRƯỞNG****Nguyễn Việt Tiến**



## LỜI NÓI ĐẦU

Trong nhiều năm qua, mặc dù những tiến bộ vượt bậc trong dự phòng và điều trị, các bệnh nhiễm khuẩn vẫn là một trong những nguyên nhân chính gây tử vong và tàn tật trên thế giới và tại Việt Nam.

Bệnh nhiễm khuẩn thường đòi hỏi các kỹ năng chẩn đoán của bác sĩ và phải được xem xét trong các chẩn đoán phân biệt khác nhau. Chẩn đoán vi sinh đã trở thành một thành phần thiết yếu và không thể tách rời của y học hiện đại và sức khỏe cộng đồng. Xét nghiệm vi sinh đóng vai trò quyết định trong chẩn đoán, điều trị, tiên lượng và giám sát các bệnh nhiễm trùng nói chung và bệnh truyền nhiễm nói riêng. Do đó, các xét nghiệm đáng tin cậy, độ lặp lại, nhanh, có hiệu quả về mặt chi phí là rất cần thiết để cung cấp các dịch vụ chăm sóc sức khỏe có chất lượng. Phát hiện chính xác vi khuẩn và đảm bảo chất lượng trong các xét nghiệm, nhằm nâng cao độ tin cậy, hiệu quả và tạo thuận lợi cho sự so sánh giữa các phòng thí nghiệm, là vấn đề cốt lõi trong cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe có chất lượng. Việc sử dụng Quy trình thực hành chuẩn trong phòng xét nghiệm vi sinh là một trong những yếu tố quan trọng nhất để đạt được chất lượng dịch vụ y tế.

Nhằm chuẩn hoá các quy trình thực hành chuẩn trong xét nghiệm vi sinh, Bộ trưởng Bộ Y tế đã ký ban hành Quyết định số 3486/QĐ-BYT ngày 11/7/2016 về việc thành lập Ban biên soạn tài liệu kỹ thuật vi sinh lâm sàng. Tài liệu chuyên môn “**Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng**” được xây dựng công phu, dựa trên các tài liệu trong nước và quốc tế, bởi các nhà chuyên gia vi sinh có kinh nghiệm lâm sàng, giảng dạy và viết sách của cả ba miền Bắc, Trung, Nam. Tài liệu bao gồm 5 chương: Kỹ thuật xét nghiệm cơ bản, Quy trình nuôi cấy phân lập, Kỹ thuật định danh vi khuẩn từ bệnh cảnh lâm sàng, Kỹ thuật kháng sinh đồ và Bảo đảm chất lượng xét nghiệm, với 50 bài hướng dẫn. Tài liệu này được xây dựng để những cán bộ vi sinh lâm sàng và bác sĩ áp dụng trong thực hành y khoa.

Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Thị Kim Tiến, Bộ trưởng Bộ Y tế đã chỉ đạo tích cực hoạt động xây dựng các hướng dẫn chuyên môn, quy trình kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh. Xin trân trọng cảm ơn các thành viên Ban biên soạn đã đóng góp nhiều kiến thức, kinh nghiệm chuyên môn và dành nhiều thời gian quý báu để biên soạn, góp ý, hoàn thiện tài liệu chuyên môn quan trọng này. Xin cảm ơn đơn vị tài trợ đã tạo điều kiện để cuốn sách được ra đời.

Tài liệu chuyên môn “**Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng**” là ấn bản đầu tiên, chắc chắn sẽ còn nhiều thiếu sót, chúng tôi rất mong nhận được sự đóng góp từ quý độc giả, đồng nghiệp để cuốn sách ngày một hoàn thiện hơn.

**THỨ TRƯỞNG BỘ Y TẾ**

**GS.TS.BS. Nguyễn Việt Tiên**





## **CHỈ ĐẠO BIÊN SOẠN**

GS.TS. Nguyễn Việt Tiến

## **CHỦ BIÊN**

PGS.TS.BS. Lương Ngọc Khuê

## **ĐỒNG CHỦ BIÊN**

PGS.TS.BS. Đoàn Mai Phương

PGS.TS.BS. Nguyễn Vũ Trung

## **THAM GIA BIÊN SOẠN**

PGS.TS. Nguyễn Thị Vinh

TS. Phạm Hùng Vân

TS.BS. Phạm Hồng Nhung

BS. CKII. Trần Thị Thanh Nga

ThS. BSCKII. Nguyễn Thị Nam Liên

ThS. BSCKII. Lê Quốc Thịnh

TS.BS. Trương Thiên Phú

TS.BS. Nguyễn Thanh Thủy

TS. Hoàng Thu Hà

TS. Nguyễn Văn Hưng

ThS.BS. Nguyễn Thị Ngọc Hà

ThS. Nguyễn Trọng Khoa

ThS.BS. Nguyễn Phú Hương Lan

## **TỔ THƯ KÝ**

TS.BS. Lê Thị Ánh Hồng

ThS.DS. Ngô Thị Bích Hà

ThS.BS. Trương Lê Vân Ngọc

ThS.BS. Phạm Thái Bình

ThS. Lê Thị Thảo

ThS. Nguyễn Thị Lê Quyên

ThS.CN. Nguyễn Đức Thắng



## CÁC THUẬT NGỮ

Đánh giá nguy cơ (Risk assessment)	Là quá trình đánh giá nguy cơ do một mối nguy hiểm gây ra trong một điều kiện cụ thể và quyết định nguy cơ đó có chấp nhận được hay không.
Độ tái lập (reproducibility)	Khi lặp lại thử nghiệm thì có thu lại được kết quả tương tự hay không?
Độ tin cậy (reliability)	Kết quả có đúng hay không?
Hậu quả (Consequence)	Mức độ trầm trọng của một sự cố.
Khả năng xảy ra (Likelihood)	Xác suất xảy ra của một sự cố nào đó.
Lợi ích - giá thành (cost - benefit ratio)	Giá thành của thử nghiệm có hợp lý so với lợi ích mang lại cho bệnh nhân và cộng đồng hay không
Nguy cơ (Risk)	Là khả năng xảy ra một sự cố liên quan đến một mối nguy hiểm gây hậu quả
Nguy hiểm (Hazard)	Là yếu tố có khả năng gây hại
Sự ích lợi/sự phù hợp về mặt lâm sàng (usefulness or clinical relevance)	Kết quả thử nghiệm giúp ích trong việc chẩn đoán và điều trị bệnh
Tốc độ (speed)	Thời gian thực hiện thử nghiệm có đủ nhanh để giúp cho việc điều trị của bác sĩ hay không
Type sinh học (biotype)	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> được phân chia thành các type sinh học: mitis, intermedius và gravis dựa trên cơ sở hình dạng khuẩn lạc (khóm)

## TỪ VIẾT TẮT TIẾNG VIỆT

A	Acid
ATSH	An toàn sinh học
BCĐN	Bạch cầu đa nhân.
KSD	Kháng sinh đồ
TBBM	Tế bào biểu mô
TCV	Tụ cầu vàng
VT	Vi trường
Chromagar	Thạch đổi màu
CLED	Cystine-lactose-electrolyte deficient
GMT	Kỹ thuật vi sinh an toàn (Good microbiological techniques)
QLCL	Quản lý chất lượng
TTB	Trang thiết bị
Yếu tố V	Nicotinamidadenin dinucleotid = NAD
Yếu tố X	Heamin

## TỪ VIẾT TẮT TIẾNG ANH

AFB	Acid fast bacilli - Trục khuẩn kháng cồn, kháng acid
ASM	American Society for Microbiology - Hội Vi sinh Hoa Kỳ
ATCC	American Type Culture Collection - Hệ thống Chuẩn chuẩn của Mỹ
BA	Blood agar - Thạch máu
BCA	Burkholderia cepacia agar
BCSA	Burkholderia cepacia selective agar
BHI	Brain heart infusion broth - Canh thang BHI, canh thang não - tim
CA	Chocolate agar - Thạch Chocolate
CATM	Chocolate Thayer Martin - Thạch CATM
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Nocobiocin agar
CFU	Colony form unit - Đơn vị hình thành khuẩn lạc
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute - Viện chuẩn thức về Lâm sàng và Xét nghiệm
CTA	Cystine Trypticase Agar
CTBA	Cystine tellurite blood agar
CLED	Cystine-lactose-electrolyte deficient
DCA	Desoxycholate citrate agar
EMB	Eosin Methylene Blue - Thạch EMB
EQA	External Quality Assesement - Đánh giá chất lượng hoặc Ngoại kiểm tra chất lượng
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Ủy ban châu Âu về thử nghiệm kháng sinh đồ
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> typ b
I	Intermediate - Trung gian
IND	Khả năng sinh indol
IQC	Internal Quality Control - Kiểm soát chất lượng hoặc Nội kiểm tra chất lượng.
K	Alkaline
KIA	Kliger's ion agar.

LAS	Loeffler agar
MAC, MC	Mac Conkey agar - Thạch Mac Conkey
MEA	Meat - extract agar
NS	Nonsusceptible - Không nhạy cảm
ODC	Ornithin Decacboxylase
OFPBL	Oxidation-fermentation Polymyxin Bacitracin Lactose agar
ONPG	Ortho-nitrophenyl B-D galactophyranosid để phát hiện galactosidase
PCR	Polymerase Chain Reaction - Phản ứng chuỗi trùng hợp
PYR	L-pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide
QA	Quality Assuranc - Đảm bảo chất lượng.
R	Resistant - Đề kháng, ức chế
S	Susceptibility - Nhạy cảm
SAB	Sabouraud agar - Thạch Sabouraud
SDD	Susceptible-dose dependent - Nhạy cảm phụ thuộc liều
SIM	Sulfide-Indole-motility
SPS	Sodium polyanethol sulfonate - Chất chống đông được thêm vào chai cấy máu
SS	Salmonella Shigella agar
SXT	Kháng sinh co-trimoxazole
TCBS	Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar
TIN	Tinsdale agar
TSA	Thạch dinh dưỡng Trypticase Soy Agar
TSI	Triple suger ion agar.
URE	Men urease
VP	Phản ứng Voges-Proskauer
WHO	World Health Organization - Tổ chức Y tế Thế giới
XLD	Xylose lysine deoxycholate agar

## MỤC LỤC

Lời nói đầu.....	7
Từ viết tắt tiếng Việt.....	12
Các thuật ngữ.....	11
Từ viết tắt tiếng Anh.....	13
<b>CHƯƠNG I. KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM CƠ BẢN</b> .....	<b>17</b>
Kỹ thuật làm tiêu bản .....	17
Kỹ thuật nhuộm Gram.....	20
Kỹ thuật nhuộm Zielh-Neelsen .....	25
Kỹ thuật nhuộm xanh Methylene .....	30
Kỹ thuật cấy phân vùng, cấy đếm .....	33
Kỹ thuật cấy vào môi trường lỏng, ống thạch nghiêng, ống thạch mềm.....	38
Kỹ thuật xác định một số tính chất sinh vật hóa học của vi khuẩn .....	43
Thử nghiệm Bacitracin .....	43
Thử nghiệm yếu tố CAMP .....	45
Thử nghiệm Catalase.....	49
Thử nghiệm sử dụng Citrat .....	52
Thử nghiệm sinh Coagulase .....	54
Thử nghiệm phát hiện tính chất di động.....	57
Trong thạch mềm .....	57
Thử nghiệm sinh Indole.....	59
Thử nghiệm trên môi trường thạch kìa .....	62
Thử nghiệm sinh Pyr.....	65
Thử nghiệm Optochin.....	67
Thử nghiệm sinh Oxidase .....	69
Thử nghiệm vệ tinh.....	72
Kỹ thuật cấy chuyển vi khuẩn.....	74
Kỹ thuật lưu giữ chủng .....	80

<b>CHƯƠNG II. QUY TRÌNH NUÔI CẤY PHÂN LẬP VI KHUẨN TỪ BỆNH PHẨM.....</b>	<b>85</b>
Quy trình cấy máu bằng phương pháp thông thường.....	85
Quy trình cấy máu bằng máy cấy máu tự động.....	93
Quy trình cấy dịch não tủy.....	102
Quy trình cấy các bệnh phẩm dịch.....	110
Quy trình cấy catheter (ống thông tĩnh mạch trung tâm).....	116
Quy trình cấy bệnh phẩm mủ.....	122
Quy trình cấy đờm bằng kỹ thuật bán định lượng.....	128
Quy trình cấy nước tiểu.....	138
Quy trình cấy phân.....	144
Quy trình cấy bệnh phẩm đường sinh dục.....	152
<b>CHƯƠNG III. KỸ THUẬT ĐỊNH DANH VI KHUẨN TỪ BỆNH PHẨM LÂM SÀNG.....</b>	<b>161</b>
Định danh các cầu khuẩn Gram dương.....	161
Định danh các cầu khuẩn Gram âm.....	166
Định danh các trực khuẩn họ <i>Enterobacteriaceae</i> .....	171
Định danh các trực khuẩn Non- <i>enterobacteriaceae</i> .....	177
Định danh vi khuẩn <i>Haemophilus influenzae</i> .....	183
Định danh vi khuẩn <i>Corynebacterium diphtheriae</i> .....	190
<b>CHƯƠNG IV. KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ.....</b>	<b>197</b>
Kỹ thuật kháng sinh đồ khoanh giấy khuếch tán.....	197
Kỹ thuật kháng sinh đồ định lượng.....	205
Hướng dẫn lựa chọn kháng sinh thử nghiệm và phiên giải kết quả kháng sinh đồ.....	214
Kiểm soát chất lượng kháng sinh đồ.....	232
<b>CHƯƠNG V. ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM VI SINH.....</b>	<b>243</b>
Hướng dẫn bố trí phòng xét nghiệm vi sinh và các trang thiết bị sử dụng trong phòng xét nghiệm vi sinh.....	243
An toàn sinh học phòng xét nghiệm.....	255
Đảm bảo chất lượng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.....	282



# Chương I

## KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM CƠ BẢN

### KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN

#### 1. Mục đích

Quy trình này hướng dẫn cách làm tiêu bản để chuẩn bị cho các phương pháp nhuộm phát hiện hình thể, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi sinh vật cũng như các thành phần khác trong bệnh phẩm (nếu có).

#### 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

#### 3. Trách nhiệm

- Người thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Người nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

#### 4. Nguyên tắc: Không áp dụng

#### 5. Trang thiết bị, vật tư

##### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc.
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng, bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

##### b. Sinh phẩm hóa chất

- Bộ thuốc nhuộm: Tùy vào kỹ thuật nhuộm mà sử dụng bộ thuốc nhuộm phù hợp
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0,9%.

#### 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất dùng để nhuộm soi phải được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng hóa chất và lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Cần có Chứng âm, Chứng dương tùy vào mỗi kỹ thuật nhuộm.

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Chuẩn bị lam kính sạch, không xước, vỡ, nhúng vào dung dịch ethanol 95%.
- Sử dụng kẹp gấp lam kính, để ráo cồn, hơ lam kính trên ngọn lửa đèn cồn.
- Dán nhãn hoặc ghi thông tin mẫu bệnh phẩm.
- Dùng bút viết kính khoanh tròn, đánh dấu vị trí phết bệnh phẩm ở mặt dưới lam kính.
- Dàn tiêu bản theo hình xoáy tròn ốc từ trong ra ngoài hoặc hình zích zắc.
- Đối với bệnh phẩm dịch não tủy, dịch rửa phế quản và các dịch khác:
  - + Ly tâm bệnh phẩm 3000 - 4000 rpm trong 10 phút, chắt bỏ nước nổi.
  - + Dùng pipet Pasteur nhỏ 1 - 2 giọt bệnh phẩm lên lam kính, không dàn tiêu bản.
- Với bệnh phẩm nước tiểu:
  - Lắc đều ống nước tiểu, lấy 10  $\mu$ l bệnh phẩm phết lên lam kính, không dàn tiêu bản.
- Với bệnh phẩm từ tăm bông (que gòn):
  - + Yêu cầu lấy 2 tăm bông (que gòn) riêng.
  - + Trường hợp chỉ có một tăm bông (que gòn) bệnh phẩm, rửa tăm bông (que gòn) trong nước muối sinh lý hoặc canh thang vô trùng, lăn tăm bông (que gòn) trên vùng đã đánh dấu trên lam kính.
- Những bệnh phẩm mũ đặc: Làm mỏng tiêu bản bằng một lam kính khác.
  - + Đặt một lam kính thứ 2 sạch lên lam kính đã phết tiêu bản.
  - + Kéo nhẹ nhàng lam kính thứ hai trên lam kính ban đầu.
  - + Nếu tiêu bản chưa đủ mỏng, tiếp tục lặp lại với một lam kính sạch khác.
- Trường hợp ít bệnh phẩm, bệnh phẩm khô: Hòa loãng trong nước muối sinh lý, dàn tiêu bản.
- Bệnh phẩm mô, mảnh sinh thiết: Nghiền, cắt nhỏ bệnh phẩm, dàn tiêu bản.
- Bệnh phẩm từ môi trường nuôi cấy lỏng, nhỏ 1 - 2 giọt lên lam kính, dàn tiêu bản.
- Bệnh phẩm từ khuẩn lạc (khóm): Pha huyền dịch vi khuẩn, dàn tiêu bản.

**9. Diễn giải kết quả và báo cáo:** Tùy từng loại đồ phiên cho các phương pháp nhuộm khác nhau sẽ có yêu cầu riêng.

## **10. Lưu ý (cảnh báo)**

Tiêu bản không quá dày, không quá mỏng.

## **11. Lưu trữ hồ sơ**

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.

# KỸ THUẬT NHUỘM GRAM

## 1. Mục đích

Quy trình này hướng dẫn nhuộm tiêu bản bằng phương pháp nhuộm Gram để phân loại vi khuẩn dựa vào hình thể, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi sinh vật.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Người thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Người nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Vi khuẩn bắt màu Gram âm hay Gram dương do sự khác nhau về thành phần, cấu trúc vách tế bào của vi khuẩn.

Vi khuẩn Gram dương có lớp peptidoglycan dày, nhiều acid teichoic, chúng không bị ảnh hưởng bởi sự tẩy màu bằng cồn, vẫn giữ nguyên được màu tím ban đầu nếu vách tế bào không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như tuổi, tác dụng của kháng sinh...

Vi khuẩn Gram âm có một lớp peptidoglycan gắn với lớp phospholipid kép, xen kẽ các protein ở màng ngoài, lớp màng này dễ bị phá hủy bởi cồn khi tẩy màu, do đó phức hợp tinh thể tím gentian - iod không bền, bị tẩy màu và màu được thay bởi các thuốc nhuộm khác.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng, bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### **b. Sinh phẩm hóa chất**

- Bộ thuốc nhuộm Gram:
- + Methanol
- + Tinh thể tím: Hucker cải tiến, tinh thể tím của Kopeloff
- + Dung dịch tẩy màu
  - Nhẹ nhất: Ethanol 95%,
  - Trung bình: Cồn acid
  - Mạnh nhất: Aceton.
- + Hóa chất nhuộm lần 2
  - Safranin

### **c. Carbon Fuschin**

- Fuschin cơ bản
- Safranin của Kopeloff
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0,9%.

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các hóa chất dùng để nhuộm soi phải được kiểm tra theo quy trình kiểm tra chất lượng, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.
- Cần có chủng chuẩn làm chứng:
  - + *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: cầu khuẩn Gram dương sẽ bắt màu tím đậm.
  - + *Escherichia coli* ATCC 25922: trực khuẩn Gram âm sẽ bắt màu hồng.

## **7. An toàn**

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Làm tiêu bản**

- Chuẩn bị lam kính sạch, không xước vỡ, nhúng vào dung dịch ethanol 95%.
- Sử dụng kẹp gấp lam kính, để ráo cồn, hơ lam kính trên ngọn lửa đèn cồn.
- Dán nhãn hoặc ghi thông tin mẫu bệnh phẩm.
- Dùng bút viết kính khoanh tròn, đánh dấu vị trí phết bệnh phẩm, mặt dưới lam kính.
- Dàn tiêu bản theo hình xoáy tròn ốc từ trong ra ngoài hoặc hình zích zắc.
- Đối với bệnh phẩm dịch não tủy, dịch rửa phế quản và các dịch khác:

- + Ly tâm bệnh phẩm 3000 - 4000 rpm trong 10 phút, chắt bỏ nước nổi.
- + Dùng pipet Pasteur nhỏ 1 - 2 giọt bệnh phẩm lên lam kính, không dàn tiêu bản.
- Với bệnh phẩm nước tiêu: Lắc đều ống nước tiêu, lấy 10  $\mu$ l bệnh phẩm phết lên lam kính, không dàn tiêu bản.
- Với bệnh phẩm từ tăm bông (que gòn):
- + Yêu cầu lấy 2 tăm bông (que gòn) riêng.
- + Trường hợp chỉ có một tăm bông (que gòn) bệnh phẩm, rũ tăm bông (que gòn) trong nước muối sinh lý hoặc canh thang vô trùng, lăn tăm bông (que gòn) trên vùng đã đánh dấu trên lam kính.
- Những bệnh phẩm mũ đặc:
- Làm mỏng tiêu bản bằng một lam kính khác.
- + Đặt một lam kính thứ hai sạch lên lam kính đã phết tiêu bản
- + Kéo nhẹ nhàng lam kính thứ hai trên lam kính ban đầu.
- + Nếu tiêu bản chưa đủ mỏng, tiếp tục lặp lại với một lam kính sạch khác.
- Trường hợp ít bệnh phẩm, bệnh phẩm khô, hòa loãng trong nước muối sinh lý, dàn tiêu bản.
- Bệnh phẩm mô, mảnh sinh thiết: Nghiền, cắt nhỏ bệnh phẩm, dàn tiêu bản.
- Bệnh phẩm từ môi trường nuôi cấy lỏng, nhỏ 1 - 2 giọt lên lam kính, dàn tiêu bản.
- Bệnh phẩm từ khuẩn lạc (khóm): Pha huyền dịch vi khuẩn, dàn tiêu bản.

### **a. Cố định tiêu bản**

- Để tiêu bản khô tự nhiên trong tủ ATSH hoặc làm khô ở 60°C.
- Cố định tiêu bản:
- + Để lam kính lên máy sấy lam ở 60°C đến khi tiêu bản khô.
- + Cố định bằng nhiệt: Đưa tiêu bản ngang qua ngọn lửa đèn cồn 2 - 3 lần, mỗi lần 5 - 10 giây.
- + Để tiêu bản nguội
- + Cố định bằng hóa chất: Nhỏ methanol phủ kín nơi dàn tiêu bản, để khô trong 1 phút, không hơ lửa.

### **b. Phủ thuốc nhuộm**

- Phương pháp Hucker cải tiến:
- + Nhỏ dung dịch tím Gentian, phủ kín nơi dàn đồ phiến, duy trì 1 phút. Đổ dung dịch tím gentian, rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy nhẹ.
- + Nhỏ dung dịch lugol, duy trì 30 giây. Đổ dung dịch lugol, rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy nhẹ.

+ Tẩy màu: Nhỏ cồn 90° lên tiêu bản, nghiêng đi nghiêng lại để cho cồn chảy từ cạnh nọ sang cạnh kia, khi màu tím trên lam kính vừa phai hết thì rửa nước ngay, loại bỏ hết cồn dưới vòi nước chảy nhẹ.

+ Nhỏ dung dịch đỏ fuchsin hoặc safranin hoặc carbon fuchsin lên tiêu bản, duy trì trong khoảng 30 giây đến 1 phút. Rửa dung dịch, rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.

- Phương pháp Kopeloff cải tiến:

+ Nhỏ dung dịch tím Gentian phủ kín nơi dàn đồ phiến, sau đó thêm khoảng 5 giọt  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , nghiêng đi nghiêng lại tiêu bản để trộn dung dịch, duy trì 15 - 20 giây, có thể để đến 2 phút.

+ Nhỏ dung dịch I-ốt Kopeloff duy trì trong ít nhất 2 phút.

+ Nghiêng tiêu bản, tẩy màu tiêu bản bằng các hóa chất tẩy màu, rửa tiêu bản ngay lập tức dưới vòi nước chảy.

- Làm khô tiêu bản trước khi soi kính.

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

### a. Quan sát tiêu bản ở vật kính x10 và x40.

- Đánh giá tiêu bản đã được tẩy màu đúng chưa.

- Tùy theo mẫu bệnh phẩm mà màu nền của tiêu bản hoặc không màu hoặc có màu Gram âm. Nếu có mặt của BCDN, BCDN phải bắt màu Gram âm hoàn toàn.

- Nếu quan sát thấy hình ảnh tế bào, xác định số lượng trung bình tế bào BCDN và tế bào biểu mô trong 20 - 40 vi trường. Bỏ qua các vi trường không có tế bào hoặc vi khuẩn và không tính số lượng trung bình cho các vi trường bỏ qua.

### b. Chuyển sang vật kính dầu quan sát hình ảnh vi khuẩn và tế bào

- Với lam nhuộm trực tiếp từ bệnh phẩm quan sát ít nhất 10 vi trường với bệnh phẩm nước tiểu, 20 - 40 vi trường với các bệnh phẩm khác.

- Quan sát hình thể vi khuẩn ở vật kính dầu (x100).

+ Hình thể: Cầu khuẩn, trực khuẩn, xoắn khuẩn, cầu trực khuẩn,...

+ Kích thước: To/nhỏ, đồng đều/đa hình thái,...

+ Tính chất bắt màu: Gram âm (bắt màu đỏ), Gram dương (bắt màu tím).

+ Cách sắp xếp: Đứng đơn lẻ, xếp thành từng cặp, xếp thành chuỗi, xếp thành từng đám,...

+ Đếm số lượng và mô tả các loại tế bào vi khuẩn sau:

+ Gram dương:

• Cầu khuẩn xếp đôi (và chuỗi)

• Cầu khuẩn xếp đám

• Trực khuẩn lớn

• Trực khuẩn nhỏ

- Trục khuẩn chia nhánh
- Trục khuẩn Coryneform
- + Gram âm:
- Song cầu
- Trục khuẩn
- Trục khuẩn chia nhánh (hoặc đa hình thái)
- Trục khuẩn Coryneform

Hình thể trung gian: Cầu trục khuẩn, phẩy khuẩn

+ Tế bào nấm nảy chồi

+ Sợi giả

+ Bán định lượng kết quả nhuộm soi được đánh giá dựa trên bảng sau.

Tế bào biểu mô hoặc bạch cầu đa nhân		Vi khuẩn hoặc nấm	
Mô tả	Số lượng*/Vật kính (x10)	Mô tả	Số lượng*/Vật kính (x100)
1+ (hiếm)	< 1	1+ (hiếm)	< 1
2+ (ít)	1 - 9	2+ (ít)	1 - 5
3+ (trung bình)	10 - 25	3+ (trung bình)	6 - 30
4+ (nhiều)	> 25	4+ (nhiều)	> 30
0	Không quan sát thấy tế bào	0	Không quan sát thấy vi khuẩn/nấm

\* Số lượng được đánh giá dựa trên trung bình số lượng tế bào/vi khuẩn/nấm trên từ 20 - 40 vi trường, không áp dụng đối với tiêu bản nhuộm từ khuẩn lạc (khóm).

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Tiêu bản không quá dày, không quá mỏng.
- Bất màu rõ ràng.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm
- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.



# KỸ THUẬT NHUỘM ZIEHL-NEELSEN

## 1. Mục đích

Quy trình này hướng dẫn nhuộm tiêu bản bằng phương pháp nhuộm Ziehl-Neelsen để phát hiện vi khuẩn kháng cồn kháng acid.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Người thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Người nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Vách tế bào các *Mycobacteria* có một lượng lớn acid mycolic nên khi sử dụng phương pháp nhuộm Gram truyền thống các vi khuẩn này rất khó bắt màu. Do đó, phải sử dụng phương pháp nhuộm kháng cồn kháng acid để quan sát các vi khuẩn này.

Phương pháp nhuộm Ziehl-Neelsen sử dụng 2 hoá chất nhuộm màu là carbol fuchsin và xanh methylen kết hợp với chất tẩy màu (hỗn hợp acid-alcohol) để phát hiện các trực khuẩn kháng cồn kháng acid.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng, bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

- Hóa chất nhuộm:
- + Dung dịch Carbol fuchsin

- + Dung dịch Acid-alcohol 3%
- + Dung dịch xanh methylen

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất dùng để nhuộm soi phải được kiểm tra theo quy trình kiểm tra chất lượng, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.
- Chứng:
  - + Chứng dương: *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177
  - + Chứng âm: *Escherichia coli* ATCC 25922

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

### a. Làm tiêu bản

- Chuẩn bị lam kính sạch, không xước vỡ, nhúng vào dung dịch ethanol 95%.
- Sử dụng kẹp gấp lam kính, để ráo còn, hơ lam kính trên ngọn lửa đèn cồn.
- Dán nhãn thông tin mẫu bệnh phẩm.
- Dùng bút viết kính khoanh tròn, đánh dấu vị trí phết bệnh phẩm, ở mặt dưới lam kính.
- Bệnh phẩm lâm sàng nghi ngờ có chứa *Mycobacteria* như: Đờm (đàm), dịch phế quản, dịch não tủy, các loại dịch khác, mô ... Hoặc khuẩn lạc (khóm) từ nuôi cấy thuần.
- Ly tâm bệnh phẩm, đổ bỏ nước nổi, lấy cặn.
- Dùng que cấy vô trùng lấy 1 vòng ống (đường kính 3mm), hoặc nhỏ một giọt bệnh phẩm lên lam kính.
- Nếu là đờm (đàm):
  - + Mở nắp cốc đờm (đàm) nhẹ nhàng, đặt nắp ngửa trên khay inox.
  - + Dùng đầu vát của que phết bằng chọn lấy chỗ đờm (đàm) nhầy mù nhẹ nhàng cắt mẫu đờm (đàm) bằng cách di cạnh vát que gỗ vào thành cốc đờm (đàm) (lưu ý: mỗi bệnh phẩm dùng que phết riêng).
  - + Đậy nắp cốc đờm (đàm).
  - + Đặt que phết có mẫu bệnh phẩm vào giữa lam kính và dàn theo vòng xoắn ốc từ trong ra ngoài, dàn đều đặn liên tục tạo độ mịn, dày vừa phải hình ô van kích thước dài 2 cm rộng 1cm.
  - + Ngâm que phết sau khi dàn vào dung dịch sát khuẩn phenol 5% hoặc Javel 0,5%.

### **b. Cố định tiêu bản**

- Để tiêu bản khô tự nhiên trong tủ ATSH hoặc làm khô ở 60°C.
- Cố định tiêu bản.
- Đặt tiêu bản lên mâm kính và để tiêu bản khô tự nhiên hoàn toàn ở nhiệt độ phòng (18-25°C).
- Lưu ý: Không làm khô tiêu bản bằng đèn cồn hoặc ánh nắng mặt trời.

### **c. Phủ thuốc nhuộm**

- Đặt tiêu bản lên giá nhuộm.
- Nhuộm màu:
  - + Phủ đầy dung dịch carbol fuchsin lên mặt tiêu bản đã được cố định.
  - + Hơ nóng trên ngọn lửa đèn cồn đến khi bốc hơi (không được để sôi) 1 lần.
  - + Để nguội tự nhiên trong 5 phút.
  - + Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.
- Tẩy màu:
  - + Phủ đầy dung dịch Acid-alcohol 3%
  - + Duy tiêu bản trong 2 phút.
  - + Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.
- Nhuộm nền:
  - + Phủ dung dịch xanh Methylen trong 1-2 phút.
  - + Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ
- Làm khô tiêu bản trước khi soi kính.

## **9. Diễn giải kết quả và báo cáo**

- Quan sát AFB bằng vật kính dầu (x100) trên kính hiển vi quang học.
- Âm tính: không quan sát thấy hình ảnh của AFB.
- Dương tính: AFB bị các trục khuẩn mảnh, bắt màu đỏ đứng riêng lẻ hay xếp đôi hoặc từng đám trên nền xanh. Đếm số lượng AFB và ghi kết quả như bảng sau:

<b>Số lượng AFB</b>	<b>Kết quả</b>	<b>Phân loại</b>
Không AFB/100 vi trường	Âm tính	
Có > 10 AFB/ 1vi trường (Soi ít nhất 20 vi trường)	Dương tính	AFB 3 (+)

Số lượng AFB	Kết quả	Phân loại
Có từ 1-10 AFB/ 1 vi trường (Soi ít nhất 50 vi trường)	Dương tính	AFB 2 (+)
Có từ 10-99 AFB/ 100 vi trường	Dương tính	AFB 1 (+)
Có từ 1-9 AFB/ 100 vi trường	Dương tính	Ghi số lượng AFB cụ thể/100 vi trường

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Chất lượng bệnh phẩm:
- + Quan sát: Tốt nhất là bệnh phẩm có nhầy mũ, không nước bọt, không có máu.
- + Tiêu chuẩn khi soi kính:
- + Có 25 BCĐN/1 vi trường (soi vật kính x10, thị kính x10).
- + Có 3-4 BCĐN/1 vi trường (soi vật kính x100, thị kính x10).
- + Hoặc có đại thực bào.
- Kích cỡ mẫu bệnh phẩm trên lam kính:
- + Hình ovan nằm ở giữa tiêu bản.
- + Chiều rộng 1 cm, chiều dài 2 cm.
- Độ mịn:
- + Bề mặt tiêu bản liên tục, đều đặn, không bị rỗng, bong.
- + Soi kính: Các vi trường liên tục không có nhiều vi trường rỗng độ sáng đều.
- Độ dày:
- + Độ dày tiêu bản khoảng 0,04 mm. Kiểm tra bằng cách khi tiêu bản khô chưa nhuộm để 1 tờ giấy có in chữ xuống dưới tiêu bản cách 4-5 cm.
- + Đạt: Nếu nhìn thấy chữ mờ, có thể đọc được.
- + Quá dày: Không đọc được chữ
- + Mỏng: Nhìn chữ rõ.
- + Soi thấu chiều sâu của tiêu bản (vi trường màu xanh sáng).
- + Nếu tiêu bản quá dày: Nhiều lớp, soi không thấu vi trường (vi trường màu xanh tối).
- + Nếu tiêu bản quá mỏng: Các vi trường thưa thớt (nền xanh nhạt).
- Nhuộm và tẩy màu:
- + Soi kính: AFB bắt màu đỏ rõ ràng trên nền màu xanh.

- + Chưa đạt: Tiêu bản nhìn bằng mắt thường mà còn màu đỏ.
- Độ sạch:
  - + Soi không thấy các cặn bản, cặn fuchsin, tinh thể....
  - + Nếu thấy các cặn bản có thể do thuốc nhuộm để lâu hoặc do hơi nóng quá lâu trong quá trình nhuộm.
- Cách kiểm tra:
  - + Tần suất kiểm tra: hàng ngày hoặc ít nhất 1 tuần/1 lần.
  - + Kiểm tra bằng 1 tiêu bản dương tính để đếm số lượng và màu của AFB.
  - + Kiểm tra bằng 1 tiêu bản âm tính để kiểm tra bộ thuốc nhuộm và nguồn nước có bị nhiễm AFB không.
  - + Ghi kết quả vào sổ kiểm tra chất lượng AFB nhạt màu có thể do tẩy quá lâu hoặc nhuộm chưa đủ (thời gian, sức nóng).
    - AFB nhạt màu có thể do tẩy quá lâu hoặc nhuộm chưa đủ (thời gian, sức nóng).
    - Nếu AFB tối màu có thể do nhuộm nên quá lâu.
    - Mỗi mẻ nhuộm không nên quá 12 tiêu bản, các tiêu bản để cách nhau ít nhất 1 cm.
    - Nhuộm Ziehl - Neelsen không đặc hiệu cho các *Mycobacteria*, các vi khuẩn không phải *Mycobacteria* như *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Legionella micdadei*, bào nang của *Cryptosporidium*, *Isospora* cũng biểu hiện màu sắc do tẩy acid ở các mức độ khác nhau.
      - Không phân biệt được *M. tuberculosis* với các vi khuẩn non-*Tuberculosis*.
      - Phương pháp này có độ nhạy thấp.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.
- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.

# KỸ THUẬT NHUỘM XANH METHYLEN

## 1. Mục đích

Quy trình này hướng dẫn nhuộm tiêu bản bằng phương pháp nhuộm xanh Metylen để phát hiện hình thể tế bào, vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.
- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Thuốc nhuộm xanh Metylen là thuốc nhuộm cation, màng tế bào mang điện tích âm nên khi cho thuốc nhuộm gây ra hiện tượng bắt màu do sự kết hợp của hai loại điện tích trái dấu. Đây là phương pháp nhuộm đơn giản để quan sát hình dạng của tế bào, vi khuẩn, được sử dụng trong phản ứng phình vỏ, định danh *Corynebacterium diphtheriae*

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng, bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

**b. Sinh phẩm hóa chất:** thuốc nhuộm Xanh methylen.

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất dùng để nhuộm soi phải được kiểm tra theo quy trình kiểm tra chất lượng, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.
- Cần có chủng chuẩn làm chứng:

*Escherichia coli* ATCC® 25922: Màu xanh

*Staphylococcus aureus* ATCC® 25923: Màu xanh

*Corynebacterium diphtheriae* ATCC® 8028: Tế bào xuất hiện từng đám, dài, có các hạt nhỏ trên nền tế bào chất màu xanh

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

### a. Nhuộm đơn giản

- Làm tiêu bản:
  - + Chuẩn bị lam kính sạch, không xước vỡ, nhúng vào dung dịch ethanol 95%.
  - + Sử dụng kẹp gấp lam kính, để ráo cồn, hơi lam kính trên ngọn lửa đèn cồn.
  - + Dán nhãn thông tin mẫu bệnh phẩm.
  - + Dùng bút viết kính khoanh tròn, đánh dấu vị trí phết bệnh phẩm ở mặt dưới lam kính.
  - + Dàn tiêu bản theo hình xoáy tròn ốc hoặc hình zích zắc.
  - + Để tiêu bản khô tự nhiên trong tủ ATSH hoặc làm khô ở 60°C.
- Cố định tiêu bản:
  - + Để lam kính lên máy sấy lam ở 60°C đến khi tiêu bản khô.
  - + Cố định bằng nhiệt: Đưa tiêu bản ngang qua ngọn lửa đèn cồn 2 - 3 lần, mỗi lần 5 - 10 giây. Để tiêu bản nguội.
  - + Cố định bằng hóa chất: Nhỏ methanol phủ kín nơi dàn tiêu bản, để khô trong 1 phút, không hơi lửa.
- Phủ thuốc nhuộm Xanh methylen duy trì 1 - 3 phút, rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.
- Làm khô tiêu bản trước khi soi kính.
- Sử dụng vật kính dầu, quan sát hình thể vi khuẩn.

### b. Nhuộm tế bào

- Nhỏ một giọt bệnh phẩm lên lam kính.
- Nhỏ 2 giọt thuốc nhuộm xanh methylen, trộn đều.
- Đặt lam lên vị trí đã trộn bệnh phẩm và thuốc nhuộm.
- Để tiêu bản trong 2 - 3 phút
- Quan sát ở vật kính x10 và x40

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Quan sát hình thể của vi khuẩn, tế bào.
- Tế bào vi khuẩn bắt màu xanh trung tính trên nền xanh nhạt.
- Tế bào bạch cầu xanh sáng, có nhân màu xanh đậm. Đếm số lượng tế bào, tính trung bình trên 1 vi trường.
- Với *C. diphtheriae* xuất hiện từng đám, dải, có các hạt nhỏ trên nền tế bào chất màu xanh đậm.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

Khi tế bào, vi khuẩn *C. diphtheria* bắt màu quá đậm không phân biệt được sự khác biệt giữa vi khuẩn và các thành phần khác.

Đôi khi khó phân biệt *Propionibacterium*, *Actinomyces* với *C. diphtheria*.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.
- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.



# KỸ THUẬT CÂY PHÂN VÙNG, CÂY ĐẾM

## 1. Mục đích

Quy trình này hướng dẫn cách cây phân vùng, cây đếm đối với vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng tại Khoa/Phòng/Bộ phận xét nghiệm Vi sinh của các bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

- Cây vi khuẩn là kỹ thuật đưa bệnh phẩm hoặc vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy để chúng phát triển nhằm mục đích tăng số lượng để phân lập, xác định tính chất của vi khuẩn.

- Cây phân vùng là kỹ thuật nuôi cấy bệnh phẩm hoặc hỗn hợp các vi khuẩn nhằm tạo ra các khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ.

- Cây đếm là kỹ thuật nuôi cấy nhằm xác định số lượng vi khuẩn có khả năng phát triển từ bệnh phẩm hoặc trong một huyền dịch vi khuẩn.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy
- Pipet Pasteur vô trùng.

### a. Sinh phẩm hóa chất

- Đĩa môi trường nuôi cấy
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0,9%.

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các loại hóa chất, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.
- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.
- Các môi trường nuôi cấy cần được kiểm tra hàng tuần, mỗi lô mới lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.
- Kiểm tra trên các chủng chuẩn ATCC.

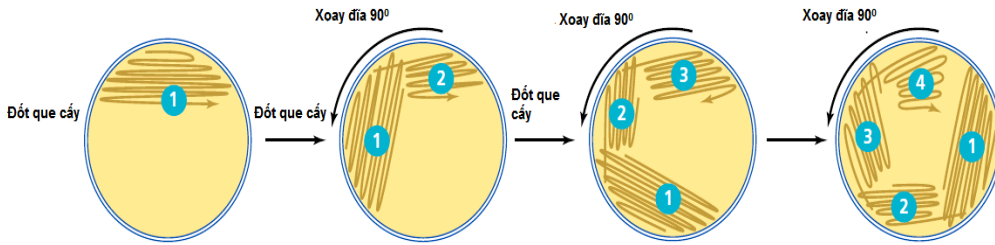
## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

### a. Cấy phân vùng

- Dán nhãn thông tin bệnh phẩm, ngày nuôi cấy.
- Đốt que cấy: Cầm que cấy thẳng đứng, đốt đầu que cấy ở nửa trên ngọn lửa đèn cồn, khi đầu que cấy đỏ, cầm ngang để khử trùng phần thân kim loại, để nguội que cấy.
- Lấy vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy: Dùng que cấy vô trùng lấy bệnh phẩm hoặc dùng pipet Pasteur nhỏ một giọt bệnh phẩm vào phần rìa của đĩa môi trường nuôi cấy dàn tạo vùng có diện tích khoảng 1 cm<sup>2</sup>. Nếu lấy bệnh phẩm bằng tăm bông (que gòn), lăn đầu tăm bông (que gòn) lên môi trường tạo vùng nguyên ủy diện tích khoảng 1 cm<sup>2</sup>.
- Tạo vùng thứ nhất: dùng que cấy đã tiệt trùng rìa qua vùng nguyên ủy, tạo thành vùng có diện tích khoảng ¼ diện tích đĩa thạch.
- Tạo vùng thứ 2: Đốt que cấy để tiệt trùng, xoay đĩa 90° rìa để tạo vùng thứ 2. Đường rìa đầu tiên cắt vào một đầu của đường rìa cuối của vùng rìa thứ nhất. Diện tích vùng rìa thứ 2 chiếm khoảng 1/4 diện tích đĩa thạch, các đường rìa sau không được phép chạm vào vùng rìa thứ nhất nữa.
- Tạo vùng rìa thứ 3: Đốt que cấy để tiệt trùng, xoay đĩa 90° rìa tạo vùng thứ 3, cách làm tương tự như tạo vùng thứ 2. Diện tích vùng thứ 3 bằng khoảng 1/4 diện tích đĩa thạch.
- Tạo vùng rìa thứ 4: Không cần đốt que cấy, xoay đĩa 90° rìa tạo vùng thứ 4, cách làm tương tự như tạo vùng thứ 2 và thứ 3. Diện tích vùng thứ 4 bằng khoảng 1/4 diện tích đĩa thạch.
- Đốt khử trùng que cấy.
- Cho vào tủ ẩm, ủ qua đêm.



**Hình 1.** Kỹ thuật cấy phân vùng trên đĩa môi trường

Các đường cấy sát vào nhau càng tận dụng được diện tích thạch để tạo thuận lợi cho các vi khuẩn mọc thành các khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ.

### **b. Cấy đếm**

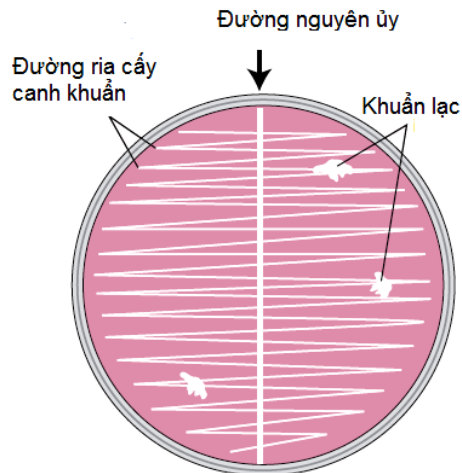
- Pha huyền dịch hoặc bệnh phẩm thành các nồng độ khác nhau  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , ... trộn đều.

+ Dùng que cấy.

+ Dùng que cấy 1  $\mu\text{l}$  hoặc 10  $\mu\text{l}$  đã tiệt trùng lấy bệnh phẩm: để que cấy thẳng đứng, chỉ nhúng đầu que cấy xuống canh khuẩn, lấy 1 ống bệnh phẩm rĩa một đường thẳng ở giữa đĩa thạch tạo đường nguyên ủy.

+ Không đốt que cấy, tiếp tục dàn đều vi khuẩn ra toàn bộ đĩa thạch, các đường rĩa đi qua đường nguyên ủy.

+ Để tủ ấm ở điều kiện thích hợp.

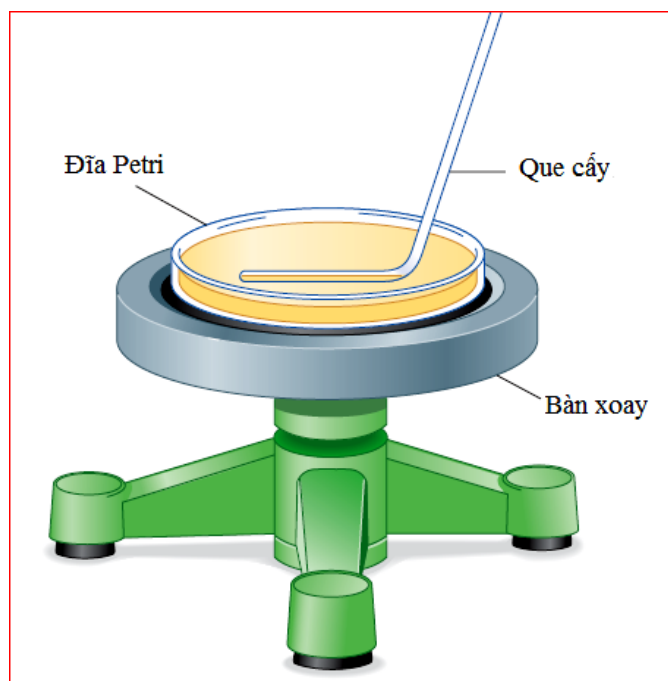


**Hình 2.** Kỹ thuật cấy đếm

- Cấy đếm bằng thanh gạt và bàn xoay.

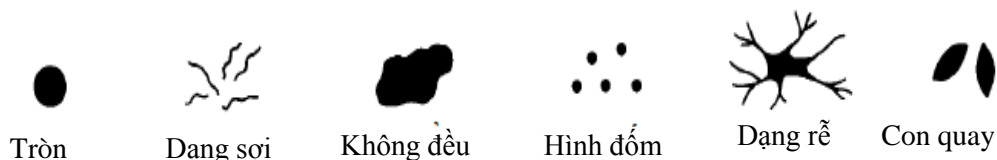
+ Nhúng thanh gạt trong dung dịch ethanol 95%: ngập phần cong và phía dưới của phần đứng. Hơ qua ngọn lửa đèn cồn để khử trùng.

- + Đặt đĩa thạch lên bàn xoay.
- + Dùng pipet chỉnh thể tích, hút một lượng bệnh phẩm hoặc canh khuẩn nhỏ vào trung tâm của đĩa thạch.
- + Bật nút bàn xoay.
- + Dùng thanh gạt chạm nhẹ vào đĩa thạch, dàn đều.
- + Khử trùng thanh gạt bằng cách nhúng vào cồn 95% và hơ trên ngọn lửa đèn cồn.
- + Cho vào tủ ẩm, ủ qua đêm.
- + Đếm số lượng khuẩn lạc (khóm) mọc trên đĩa thạch, tính số lượng vi khuẩn có trong bệnh phẩm (canh khuẩn).



## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

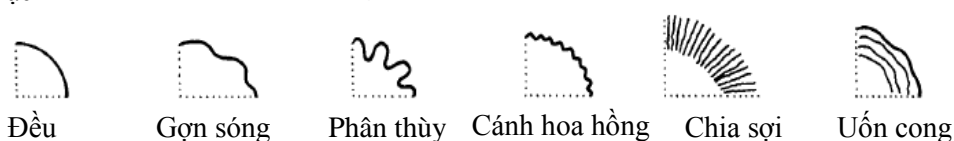
- Mô tả các dạng khuẩn lạc (khóm) trên đĩa nuôi cấy:
- + Kích thước:
  - Nhỏ: đường kính khuẩn lạc (khóm) nhỏ hơn 1mm
  - Trung bình: đường kính khuẩn lạc (khóm) bằng 1mm
  - To: đường kính khuẩn lạc (khóm) lớn hơn 1 mm.
- + Màu sắc khuẩn lạc (khóm)
- + Biểu hiện bề mặt: nhẵn, xù xì, lấp lánh, hạt...
- + Hình dạng khuẩn lạc (khóm)



Độ cao



Rìa khuẩn lạc



+ Mật độ khuẩn lạc (khóm): đục, mờ, trong suốt

+ Tính chất: nhầy, mủn, mỡ...

- Kết quả về số lượng:

Số lượng	Phiên giải
Rất ít	Mọc 1 - 5 khuẩn lạc (khóm)
1+	Chỉ mọc ở vùng 1 hoặc có thêm vài khuẩn lạc (khóm) ở vùng 2
2+	Chỉ mọc ở vùng 2 hoặc có thêm vài khuẩn lạc (khóm) ở vùng 3
3+	Chỉ mọc ở vùng 3 hoặc có thêm vài khuẩn lạc (khóm) ở vùng 4
4+	Mọc ở vùng 4

+ Trả kết quả về số lượng + CFU/ ml với bệnh phẩm nước tiểu, những bệnh phẩm cấy định lượng.

+ Trả CFU với bệnh phẩm cấy Catheter.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

Cấy phân vùng phải tạo được khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu tiến trình nuôi cấy vi khuẩn.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy trình lưu trữ hồ sơ.

# KỸ THUẬT CÂY VÀO MÔI TRƯỜNG LÔNG, ỚNG THẠCH NGHIÊNG, ỚNG THẠCH MỀM

## 1. Mục đích

- Quy trình này mô tả/hướng dẫn cách cấy vi khuẩn vào môi trường lông, thạch mềm, thạch nghiêng.

- Môi trường lông được dùng để tăng số lượng vi khuẩn, xác định tính chất sinh vật hóa học của vi khuẩn.

- Thạch nghiêng có mặt nghiêng, thường được sử dụng để kiểm tra độ thuần nhất của mẫu vi khuẩn, trong giữ chủng, xác định tính chất sinh vật hóa học của vi khuẩn.

- Thạch mềm là môi trường có tỷ lệ thạch thấp hơn môi trường đặc, nhưng chưa ở trạng thái lỏng. Dùng để xác định tính chất di động của vi khuẩn, đôi khi cũng dùng để giữ chủng trong một thời gian ngắn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Người thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Người nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Quy trình này được áp dụng tại khoa/phòng xét nghiệm Vi sinh của các bệnh viện

## 4. Nguyên tắc: Không áp dụng

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

Các ống môi trường để nuôi cấy, định danh vi khuẩn.

## 6. Kiểm tra chất lượng

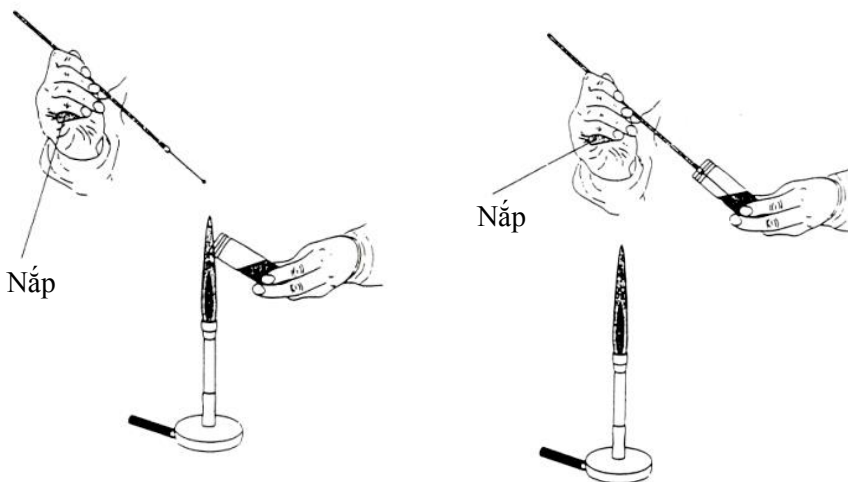
- Các loại hóa chất, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.
- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.
- Các môi trường nuôi cấy cần được kiểm tra hàng tuần, mỗi lô mới, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.
- Kiểm tra trên các chủng chuẩn ATCC.

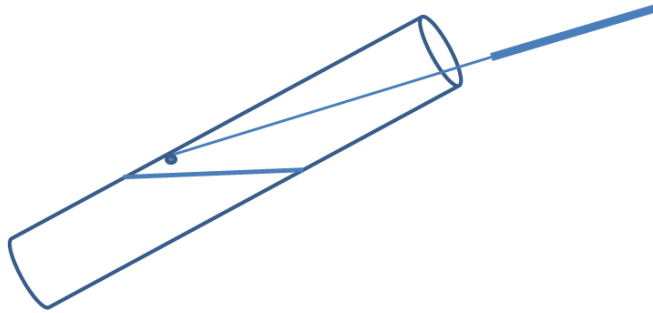
## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Dán nhãn mã số bệnh phẩm, ngày nuôi cấy trên các ống môi trường.
- Đốt que cấy: cầm que cấy thẳng đứng, đốt đầu que cấy ở nửa trên ngọn lửa đèn cồn, khi đầu que cấy đỏ, cầm ngang tiệt trùng phần thân kim loại, để nguội que cấy.
- Dùng ngón trỏ và ngón cái của tay thuận cầm vào ống nghiệm, đáy ống đặt vào hõm giữa 2 ngón tay trỏ và cái của tay kia. Trong quá trình thao tác, ống nghiệm luôn cầm ở một góc 45° so với mặt phẳng ngang.
- Mở nút ống môi trường: Dùng ngón cái và ngón trỏ của tay còn lại cầm que cấy, ngón út kẹp vào nắp vừa xoay vừa rút.
- Cấy vào môi trường lỏng:

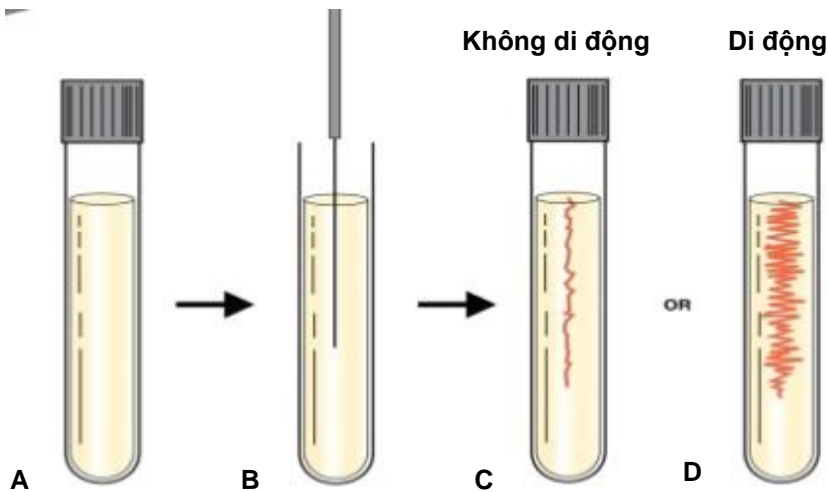




**Hình 1.** Kỹ thuật cấy vào môi trường lỏng

- + Khử trùng que cấy.
- + Mở nắp ống môi trường lỏng, hơ lửa miệng ống. Để nghiêng khoảng  $45^\circ$ .
- + Đưa que cấy vào thành môi trường nuôi cấy đối diện với môi trường lỏng ở khu vực sẽ có môi trường khi dựng thẳng ống (chú ý, trong quá trình đưa que cấy, không chạm vào thành hay miệng ống). Cũng có thể đưa đầu que cấy có vi khuẩn nhúng vào môi trường lỏng.
- + Nghiền que cấy vào thành ống cho vi khuẩn dính vào thành ống là được.
- + Hơ lửa miệng ống, đậy nắp và để ống nuôi cấy mới vào khay.
- + Đốt que cấy
- + Kiểm tra lại các nắp ống đảm bảo đủ chặt (không quá chặt)
- + Đặt ống nuôi cấy vào môi trường thích hợp
- Cấy vào môi trường thạch mềm:
  - + Dùng que cấy thẳng không có vòng ở đầu, đốt khử trùng que cấy trên ngọn lửa đèn cồn.
  - + Chạm que cấy vào một khuẩn lạc (khóm).
  - + Mở nút ống nghiệm, khử trùng miệng ống trên ngọn lửa đèn cồn.
  - + Cắm đầu que cấy vào chính giữa, sâu xuống khoảng 1,5 - 2,5 cm so với mặt thạch.
  - + Rút que cấy ra sao cho đường cấy càng gọn càng tốt.
  - + Khử trùng miệng ống, đậy nắp ống môi trường.
  - + Đặt lên giá, cho vào tủ ẩm.





**Hình 2.** A: Ống chưa cấy vi khuẩn, B: Ống đã cấy vi khuẩn, C: Kết quả vi khuẩn không di động, D: Kết quả vi khuẩn di động

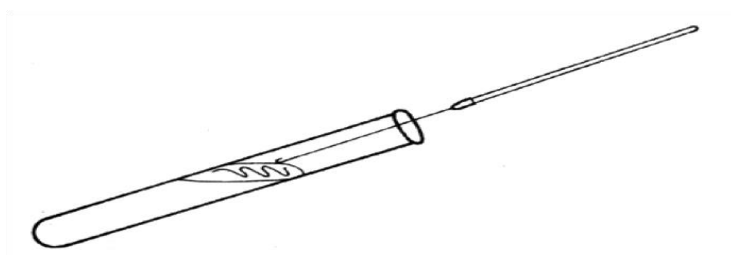
- Cấy vào môi trường thạch nghiêng

+ Dùng que cấy lấy vi khuẩn, nếu là huyền dịch thì lấy một vòng cấy, nếu là khuẩn lạc (khóm) thì chạm que cấy lên chỗ phẳng nhất của mặt khuẩn lạc (khóm).

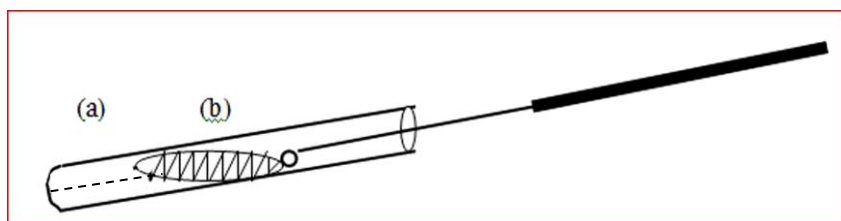
+ Mở nút ống môi trường, khử trùng miệng ống.

+ Đặt đầu que cấy đã lấy vi khuẩn vào chỗ thấp nhất của mặt thạch, ria đi ria lại, vừa ria vừa đưa dần que cấy lên cao đến hết mặt thạch.

+ Khử khuẩn miệng ống, đậy nắp môi trường, cho vào tủ ẩm.



**Hình 3.1.** Ria cấy khuẩn lạc (khóm) trên mặt thạch nghiêng



**Hình 3.2.** Cấy khuẩn lạc (khóm) vào ống thạch nghiêng, phần đứng (a) và phần nghiêng (b)

**9. Diễn giải kết quả và báo cáo:** Không áp dụng

**10. Lưu ý (cảnh báo)**

Chỉ lấy một loại khuẩn lạc (khóm) thuần, bằng cách chạm ăng vào đầu khuẩn lạc (khóm).

**11. Lưu trữ hồ sơ**

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu tiến trình nuôi cấy vi khuẩn.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy trình lưu trữ hồ sơ.

# KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TÍNH CHẤT SINH VẬT HÓA HỌC CỦA VI KHUẨN

## THỬ NGHIỆM BACITRACIN

### 1. Mục đích

Quy trình thử nghiệm tính nhạy cảm với bacitracin dùng để phân biệt *Streptococcus pyogenes* với các liên cầu tan máu (tiêu huyết)  $\beta$  khác, liên cầu nhóm A nhạy cảm với bacitracin.

### 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

### 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

### 4. Nguyên tắc

Bacitracin là kháng sinh phân lập được từ *Bacillus subtilis*, ức chế tổng hợp vách tế bào thông qua ức chế quá trình tổng hợp peptidoglycan. SXT ức chế trao đổi folate, ức chế tổng hợp DNA. Liên cầu A nhạy cảm với bacitracin hơn là những liên cầu tan máu (tiêu huyết)  $\beta$  khác. Những nghiên cứu gần đây cho thấy Liên cầu nhóm A nhạy với bacitracin và SXT.

### 5. Trang thiết bị, sinh phẩm

#### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II.
- Tủ ấm
- Đèn cồn, que cấy, panh, ống nghiệm thủy tinh vô trùng, giá đựng ống nghiệm.

#### b. Hóa chất

- Thạch máu chứa 5 -7% máu thỏ hoặc máu cừu.
- Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm.
- Khoanh giấy bacitracin D40/D40C 0,04 units hoặc D41/D41C 0,1units
- Khoanh giấy SXT

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các loại hóa chất, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

- Các môi trường nuôi cấy cần được kiểm tra hàng tuần, mỗi lô mới, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.

- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Lấy thạch máu ủ ấm hoặc để ở nhiệt độ phòng trước khi thực hiện.

- Lấy 3, 4 khuẩn lạc (khóm) ria trên thạch máu.

- Dùng panh gấp khoan giấy bacitracin và SXT đặt lên vùng đã ria khuẩn lạc (khóm).

- Đặt vào tủ ẩm CO<sub>2</sub> 35 - 37°C trong 18 - 24 giờ.

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Dương tính: nếu có vòng ức chế quanh khoan hoặc đĩa bacitracin D40 0,04units, hoặc đường kính vùng ức chế 12mm quanh khoan D41 0,1 units.

- Âm tính: không có vòng ức chế.

Mức độ nhạy cảm Bacitracin	Mức độ nhạy cảm SXT	Diễn giải kết quả
S	R	Group A b- <i>Streptococci</i>
R	R	Group B b- <i>Streptococci</i>
R	S	Không phải Group A hoặc B b- <i>Streptococci</i>
S	S	Loại trừ Group A hoặc B bằng các test huyết thanh

## 10. Lưu ý, cảnh báo: Không áp dụng

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu tiến trình nuôi cấy vi khuẩn.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy trình lưu trữ hồ sơ.

# THỬ NGHIỆM YẾU TỐ CAMP

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện thử nghiệm sinh yếu tố CAMP của một số vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

*Streptococcus agalactiae* tạo ra một loại protein chịu nhiệt, ngoài tế bào, có thể khuếch tán, tác động hiệp đồng với yếu tố tan máu (tiêu huyết) beta (beta-lysin) do *Staphylococcus aureus* sản xuất ra để tạo thành một vùng ly giải trong môi trường chứa hồng cầu cừu hoặc bò. Protein này tên là yếu tố CAMP (CAMP factor) là từ ghép từ chữ bắt đầu của tên các tác giả bài báo đầu tiên mô tả hiện tượng này. Test CAMP chuẩn dựa vào sự tương tác giữa hai yếu tố này trong quá trình nhân lên của vi khuẩn để tạo nên một vùng trong suốt hình ngọn lửa hay đầu mũi tên tại vùng gặp nhau của hai vi khuẩn này khi chúng được đặt vuông góc với nhau. Test nhanh sử dụng mẫu tách chiết beta-lysin của *Staphylococci* tác dụng trực tiếp với yếu tố CAMP đã khuếch tán vào môi trường chứa khuẩn lạc (khóm) *S. agalactiae*. Phản ứng CAMP dương tính được xác nhận bằng hiện tượng tan máu (tiêu huyết) tiến triển trong vòng 30 phút sau khi thêm yếu tố CAMP vào. Test này được sử dụng để định danh *S. agalactiae* và nhiều trực khuẩn Gram dương khác bao gồm cả *Listeria monocytogenes*.

Phản ứng CAMP đảo ngược là phản ứng trong đó hiện tượng tan máu (tiêu huyết) do beta-hemolysin của *Staphylococci* bị ức chế do sự sản sinh ra phospholipase C hoặc D bởi một số vi khuẩn (ví dụ: *S. agalactiae*, *Listeria*, *Corynebacterium spp.*). Phản ứng dương tính khi có một vùng không tan máu hình thành giữa chỗ tiếp xúc của vi khuẩn đang cần thử với *Staphylococci*.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2

- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng đậy (coverslip) bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### **b. Sinh phẩm hóa chất**

- Chủng *S. aureus* ATCC 25923
- Thuốc thử thương mại:
  - + Khoang giấy chứa beta-lysin của *S. aureus* (số SS697; Remel, Inc.): Bảo quản ở 4°C.
  - + Thuốc thử dạng dung dịch CAMP nhỏ giọt (số Z206; Hardy Diagnostics)

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.
- Chứng:
  - + Chứng Dương: *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386
  - + Chứng Âm: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

## **7. An toàn**

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Phương pháp chuẩn**

- Cấy *S. aureus* ATCC 25923 theo một đường thẳng ở giữa đĩa thạch.
- Ria chủng vi khuẩn chưa biết theo một đường thẳng vuông góc với đường cấy *S. aureus* nhưng không chạm vào đường đó.
- Ria chủng làm chứng dương song song và cách đường ria chủng cần xác định khoảng 1 inch (2,54 cm).
- Đè tên mỗi đường ria vào mặt sau của đĩa.
- Ủ đĩa qua đêm ở 35°C trong tủ ẩm có CO<sub>2</sub>.

### **b. Phương pháp dùng khoan giấy**

- Đặt khoan giấy chứa betalysin trên thạch máu đã làm ấm.
- Ria chủng vi khuẩn cách bờ khoan giấy khoảng 2-3 mm.
- Ủ đĩa qua đêm ở 35°C trong tủ ẩm có CO<sub>2</sub>.

### **c. Phương pháp nhỏ giọt nhanh**

- Nhỏ 1 giọt thuốc thử (hoặc lấy bằng ống đong 10µl) cạnh khuẩn lạc (khóm) của *S. agalactiae* trên thạch máu. Dung dịch có thể chạm vào khuẩn lạc (khóm).
- Ủ đĩa (nấp ở trên) để tránh giọt thuốc thử chạy ngang qua mặt đĩa, trong 20 phút ở 35°C.
- Kiểm tra bằng đèn soi xem có vùng tan máu (tiêu huyết) cạnh khuẩn lạc (khóm) không.
- Ủ lại 30 phút nếu phản ứng ban đầu âm tính. Sử dụng kính lúp, nếu cần, để quan sát đĩa.
- Có thể để tủ lạnh sau khi ủ để thúc đẩy phản ứng.

## **9. Diễn giải kết quả và báo cáo**

- Kết quả dương tính trong phương pháp chuẩn: có khoảng tan máu (tiêu huyết) hình đầu mũi tên ở chỗ giao giữa đường rìa của *S. aureus* và chủng cần xác định sinh yếu tố CAMP.
- Test CAMP đảo ngược hoặc phospholipase D dương tính: Có khoảng không tan máu (tiêu huyết) hình mũi tên ở chỗ giao cắt của 2 chủng tan máu (tiêu huyết).
- Nếu sử dụng khoan giấy, kết quả dương tính xác định khi có vùng tan máu (tiêu huyết) hoàn toàn hình trăng lưỡi liềm/hình cung ở chỗ giao giữa beta-lysin và chủng cần xác định.
- Trong test giọt nhỏ nhanh, sự xuất hiện của vùng tan máu (tiêu huyết) rộng ra ở những nơi thuốc thử thấm vào là dương tính.
- Không có vùng tan máu (tiêu huyết) mở rộng ra xung quanh khuẩn lạc (khóm) thì phản ứng là âm tính.

## **10. Lưu ý (cảnh báo)**

- Vùng tan máu (tiêu huyết) mở rộng không đặc trưng ở vùng giao cắt có thể quan sát được ở một số chủng liên cầu khác nhưng chỉ liên cầu nhóm B sinh vùng tan máu (tiêu huyết) dạng đầu mũi tên. Xác nhận liên cầu nhóm B dựa vào hình thái khuẩn lạc (khóm) và tính chất tan máu (tiêu huyết).
- Xét nghiệm có độ nhạy 98% trong phát hiện *S. agalactiae*. Các chủng có test CAMP âm tính vẫn có thể là *S. agalactiae* và cần phải đánh giá thêm bằng các test khác.

- *S. pyogenes* có thể cho phản ứng dương tính. Khi nghi ngờ, *S. pyogenes* có test PYR (pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide) Dương tính còn *S. agalactiae* thì PYR Âm tính.

- Test CAMP giúp phân biệt *L. monocytogenes*, là tác nhân gây bệnh cho người với các loài *Listeria* khác.

- Nếu thạch quá mỏng hoặc đã bị tan máu (tan máu, tiêu huyết, hemolyzed), phản ứng có thể yếu.

## **11. Lưu trữ hồ sơ**

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.



# THỬ NGHIỆM CATALASE

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện thử nghiệm phát hiện tính chất sinh catalase của vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Vi khuẩn sinh enzyme catalase để thủy phân  $H_2O_2$  thành  $H_2O$  và  $O_2$ , tạo ra bọt khí. Xét nghiệm này được dùng để phân tích đặc điểm ban đầu của hầu hết các vi khuẩn.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng đậy (coverslip) bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

- $H_2O_2$  30% đối với *Neisseria*
- $H_2O_2$  15% đối với vi khuẩn kỵ khí
- $H_2O_2$  3% đối với các vi khuẩn khác (mua hoặc pha loãng dung dịch 30% tỉ lệ 1:10 bằng nước khử ion trước khi sử dụng).

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Chứng:

+ Chứng Dương: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

+ Chứng Âm: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.

- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Khởi động tủ ATSH ít nhất 15 phút trước khi thực hiện.

- Sắp xếp các dụng cụ cần thiết vào tủ ATSH.

- Chọn một khuẩn lạc (khóm) tách biệt rõ, đã được 18-24 giờ, chuyển sang lam kính sạch.

- Nhỏ 1 giọt thuốc thử  $H_2O_2$  lên lam kính và quan sát trên nền tối ngay lập tức hiện tượng sủi bọt.

- Bỏ lam kính vào thùng chứa vật sắc nhọn.

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Test dương tính khi có sủi bọt ngay lập tức.

- Phản ứng yếu nếu chỉ có 1-2 bóng khí.

- Phản ứng âm tính khi không có bóng khí hoặc chỉ có một ít bóng khí sau 20 giây.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Hồng cầu cũng có catalase. Để tránh dương tính giả, khi lấy khuẩn lạc (khóm) trên thạch máu tránh lấy cả thạch.

- Không làm test từ chủng cấy trên thạch Mueller-Hinton.

- Lấy khuẩn lạc (khóm) bằng que gỗ hoặc nhựa.

- Không làm test với các khuẩn lạc (khóm) đã quá 24 giờ vì có thể gây âm tính giả.

- Không làm ngược lại trình tự vì có thể gây âm tính giả.

- Không trộn thuốc thử và khuẩn lạc (khóm) lên.

- Một số chủng *S. aureus* có thể có catalase âm tính theo phương pháp này. Xem test aminolevulinic acid (ALA) để xét nghiệm thêm với các chủng nghi ngờ này.

- Để xác định không có catalase đối với *Gardenerella vaginallis*, Reimer và Reller khuyến cáo ria trên thạch chocolate như làm kháng sinh đồ và cấy thêm một chấm nhỏ chủng *Streptococci viridans* (*Streptococcus sanguis* ATCC 35557). Vùng ức chế xung quanh chấm *S. viridans* sẽ khẳng định là không có catalase.

## **12. Lưu trữ hồ sơ**

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.

# THỬ NGHIỆM SỬ DỤNG CITRAT

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện thử nghiệm phát hiện sử dụng citrat của vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Thạch citrate được sử dụng để kiểm tra khả năng sử dụng citrate là nguồn năng lượng của vi khuẩn. Môi trường có chứa citrate là nguồn các-bon duy nhất, muối ammonium là nguồn ni-tơ chính. Nếu có vi khuẩn phát triển chứng tỏ có sử dụng citrate. Khi vi khuẩn chuyển hóa citrate, muối ammonium sẽ bị giáng hóa thành ammoniac làm kiềm hóa môi trường. Chất chỉ thị xanh bromthymol trong môi trường sẽ chuyển từ màu xanh lá cây sang màu xanh nước biển khi pH trong môi trường trên 7,6.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng (coverslip) bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

- Thạch nghiêng chứa citrate, muối ammonium, đệm, xanh bromthymol.
- Nước muối sinh lý 0,9%.

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Chứng:

+ Chứng Âm: *Escherichia coli* ATCC 25922

+ Chứng Dương: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.

- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Dùng que cấy lấy một khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ (lấy phần phòng nhất của khuẩn lạc (khóm)).

- Đốt miệng ống thạch, ria cấy lên bề mặt thạch nghiêng, đậy nắp ống.

- Ủ trong môi trường hiếu khí 35 - 37°C tối đa trong 4 ngày.

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Dương tính: có khi vi khuẩn phát triển và làm đổi màu môi trường từ màu xanh lá cây sang xanh nước biển trên bề mặt thạch nghiêng.

- Âm tính: không có vi khuẩn mọc và môi trường vẫn giữ nguyên màu xanh lá cây.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Nếu thử nghiệm cho kết quả không rõ ràng cần làm lại.

- Vi khuẩn phát triển mạnh trên thạch nhưng không làm đổi màu môi trường có thể là thử nghiệm dương tính, cần ủ thêm hoặc làm lại thử nghiệm với ít khuẩn lạc (khóm) hơn.

- Không cấy vi khuẩn vào phần đứng của thạch.

- Không thử nghiệm bằng vi khuẩn từ môi trường lỏng.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.

# THỬ NGHIỆM SINH COAGULASE

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện thử nghiệm sinh coagulase của vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Coagulase là chất giống thrombin, có thể chịu nhiệt, có khả năng hoạt hóa fibrinogen thành fibrin, tạo thành cục đông fibrin. Hiện tượng này được biểu hiện trong thử nghiệm hình thành cục đông khi cho vi khuẩn thuộc chi *Staphylococcus* vào huyết tương. Vi khuẩn sinh coagulase tự do, được giải phóng từ tế bào. Ở hầu hết các chủng *S. aureus*, fibrinogen gắn trên bề mặt tế bào gọi là “coagulase liên hợp” hoặc “yếu tố kết cụm”. Nhờ yếu tố này, vi khuẩn có khả năng tác động trực tiếp lên fibrinogen trong huyết tương để gây đông vón trên lam kính.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng (coverslip) bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

- Huyết tương chống đông bằng EDTA đã loại nước và pha loãng 1:10
- Nước muối sinh lý 0,9%.

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Chứng:

+ Chứng Dương: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

+ Chứng Âm: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.

- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Thử nghiệm trên lam kính:

+ Nhỏ 10 µl nước khử ion trên lam kính hoặc tấm nhựa đen.

+ Hòa một vài khuẩn lạc (khóm) vào nước để có một hỗn dịch đục đều.

+ Nhỏ 1-3 µl huyết tương thô và quan sát hiện tượng đông vón xảy ra trong vòng 10 giây.

+ Sau thử nghiệm, bỏ tấm nhựa vào thùng chứa chất thải truyền nhiễm hoặc lam kính vào thùng chứa vật sắc nhọn.

- Thử nghiệm trong ống:

+ Để ống huyết tương ở nhiệt độ 25°C.

+ Lấy vào ống 1 khuẩn lạc (khóm) của tụ cầu nuôi cấy từ môi trường không ức chế hoặc nhỏ 2 giọt máu từ mẫu cấy máu dương tính.

+ Không lắc ống trong quá trình quan sát, nghiêng nhẹ để phát hiện đông vón.

+ Ủ thêm 20 giờ ở 25°C nếu sau 4 giờ không hình thành đông vón.

+ Ngoài ra có thể để ống ở 35°C và nhỏ 1 hoặc 2 giọt CaCl<sub>2</sub> 5% sau 24 giờ.

+ Nếu đông vón hình thành, vi khuẩn có coagulase.

+ Không có cục đông sau 24 giờ ở 35°C nhưng sau đó nhỏ 1-2 giọt CaCl<sub>2</sub> 5% vào ống thì cục đông hình thành.

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

### a. Thử nghiệm trên lam kính

- Thử nghiệm: Dương tính nếu có ngưng kết tế bào vi khuẩn sau khi nhỏ huyết tương.

- Thử nghiệm: Âm tính nếu không có sự ngưng kết.

### **b. Thử nghiệm trong ống nghiệm**

- Thử nghiệm Dương tính nếu có 1 trong các tiêu chuẩn sau:
  - + Nếu có đông vón hình thành hoàn toàn hoặc không hoàn toàn trước 24 giờ.
  - + Không có đông vón hình thành sau khi thêm 1-2 giọt  $\text{CaCl}_2$  5% vào ống không có đông vón sau 24 giờ.
- Thử nghiệm Âm tính khi có 1 trong các tiêu chuẩn dưới đây:
  - + Không hình thành cục máu đông sau 24 giờ ở  $25^\circ\text{C}$ .
  - + Không có đông vón sau 24 giờ ở  $35^\circ\text{C}$  nhưng sau đó nhỏ 1-2 giọt  $\text{CaCl}_2$  5% vào ống thì cục đông hình thành.

### **10. Lưu ý (cảnh báo)**

- *S. aureus* kháng methicillin có thể không có đủ coagulase liên kết nên kết quả thử nghiệm lam kính sẽ âm tính.
- *S. intermedius* và *S. hyicus* có thể cho kết quả Dương tính khi thử nghiệm trong ống.
- Không sử dụng máu chống đông bằng citrate vì có thể làm Dương tính giả.
- Thử nghiệm coagulase không thể làm với các khuẩn lạc (khóm) trên thạch muối mannitol.

### **11. Lưu trữ hồ sơ**

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.
- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.



# THỬ NGHIỆM PHÁT HIỆN TÍNH CHẤT DI ĐỘNG TRONG THẠCH MỀM

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện kỹ thuật xác định tính chất di động của vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.
- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Kỹ thuật xác định tính chất di động được sử dụng để phát hiện vi khuẩn có lông (flagella), biểu hiện bằng việc vi khuẩn phát triển vượt ra ngoài đường cấy ban đầu trong môi trường thạch mềm.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2.
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm.
- Máy trộn, lắc.
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy nhọn, lam kính, lá kính mỏng đậy (coverslip) bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

- Môi trường thạch mềm để phát hiện sự di động.

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Chúng:
- + Chúng Dương: *Escherichia coli* ATCC 25922
- + Chúng Âm: *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Thử nghiệm trong ống đối với *Enterobacteriaceae*, trực khuẩn Gram âm không lên men và *Listeria*.

- Dùng que cấy vô trùng, lấy một khuẩn lạc (khóm) thuần và cấy thẳng vào môi trường thạch mềm theo một đường thẳng từ trên xuống dưới qua trung tâm vào sâu ½ inch đối với ống nghiệm loại nhỏ và 1 inch (2,54 cm) với các ống nghiệm lớn hơn.

- *Enterobacteriaceae* được để ở điều kiện 35°C trong 24 giờ.
- Trực khuẩn Gram âm không lên men và Enterococci ủ ở 30°C trong 24 giờ.
- Nếu nghi ngờ về kết quả âm tính, ủ ở 25°C.
- *Listeria* và *Yersina*, ủ 2 ống ở 35°C và 1 ống ở 25°C.

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Thử nghiệm Dương tính: vi khuẩn phát triển khuếch tán ra ngoài đường cấy hoặc làm đục môi trường.

- Vi khuẩn không di động: ống trong suốt (tương tự như môi trường khi chưa cấy) có vi khuẩn chỉ mọc trong đường cấy.

- Trong môi trường có triphenyltrazolium chloride, vùng vi khuẩn mọc có màu đỏ. Vi khuẩn di động sẽ tạo ra màu hồng khuếch tán ra từ đường cấy. Các vi khuẩn không di động sẽ cho sắc tố đỏ hồng trong đường cấy.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Các chủng *Klebsiella* có vỏ nhầy, không di động có thể làm phản ứng di động dương tính giả trong môi trường thạch mềm: do các chủng này thoát vào giữa môi trường và ống, tạo nên độ đục thường dễ bị nhầm với tính di động.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.

# THỬ NGHIỆM SINH INDOLE

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện thử nghiệm phát hiện tính chất sinh indole của vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Vi khuẩn có khả năng sinh indole từ acid amin tryptophan do có mentryptophanase. Indole được sinh ra sẽ kết hợp với aldehyde trong thuốc thử để tạo ra phức hợp quinoid màu hồng hoặc đỏ tím (với thuốc thử benzaldehyde) hoặc màu xanh nước biển/xanh lá cây (với thuốc thử cinnamaldehyde).

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng đậy (coverslip) bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

- Có thể dùng thuốc thử thương mại hoặc tự pha.
- Thử nghiệm indole nhỏ giọt nhanh:

+ Chuẩn bị p-dimethylaminobenzaldehyde 5% hoặc para-dimethyl-amino-cinnamaldehyde 1% trong dung dịch HCl 10%.

+ Không sử dụng thuốc thử benzaldehyde dạng nhỏ giọt cho vi khuẩn kỵ khí.

- Thử nghiệm indole trong ống nghiệm.

+ Phương pháp Kovac cho vi khuẩn hiếu khí:

- Thuốc thử Kovac

- Môi trường: canh thang chứa tryptophan (chứa peptone, tryptone hoặc casein).

+ Phương pháp Ehrlich cho vi khuẩn kỵ khí và sinh indole yếu:

- Thuốc thử Ehrlich

- Môi trường: môi trường heart infusion hoặc môi trường kỵ khí chứa tryptophan.

- Xylene.

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Chứng:

+ Chứng Âm: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

+ Chứng Dương: *Escherichia coli* ATCC 25922

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.

- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Indole nhỏ giọt (test nhanh). Sử dụng một trong các kỹ thuật dưới đây:

+ Làm ẩm giấy lọc bằng thuốc thử. Sử dụng que gỗ, lấy khuẩn lạc (khóm) lên giấy lọc.

+ Lấy khuẩn lạc (khóm) bằng tăm bông (que gòn). Nhỏ một giọt indole vào đầu tăm bông chứa khuẩn lạc (khóm).

+ Thêm trực tiếp thuốc thử vào khuẩn lạc (khóm) trên mặt thạch.

- Thử nghiệm trong ống nghiệm:

+ Cây khuẩn lạc (khóm) vào môi trường lỏng hoặc thạch nghiêng.

+ Ủ ở 18-24 giờ. Nếu sử dụng canh thang để làm thử nghiệm indole, đổ một phần môi trường sang ống thứ 2 trước khi làm test.

- Phương pháp Ehrlich:

+ Thêm 0-5 ml xylene vào ống và trộn lên rồi để lắng.

+ Nhỏ 6 giọt thuốc thử Ehrlich lên thành trong của ống và quan sát màu dưới lớp xylene.

- Phương pháp Kovac: Nhỏ 3 giọt thuốc thử Kovac lên thành ống và quan sát sự thay đổi màu ở bề mặt của chất lỏng.

- Nếu test Âm tính: làm lại test sau khi ủ thêm 24 giờ nếu cần thiết.

## **9. Diễn giải kết quả và báo cáo**

- Dung dịch chuyển màu từ đỏ nâu sang đỏ tím (thuốc thử bezaldehyde) màu xanh nước biển (thuốc thử cinnamaldehyde) trong vòng 20 giây chứng tỏ có mặt indole.

- Test Âm tính khi không màu hoặc vàng nhạt, màu tím trên khuẩn lạc (khóm).

## **10. Lưu ý (cảnh báo)**

- Indole sinh ra sẽ khuếch tán tới các khuẩn lạc (khóm) trong vòng 5 mm từ một khuẩn lạc (khóm) khoảng 2-3 mm nên có thể cho Dương tính giả.

- Không sử dụng môi trường chứa thuốc nhuộm (ví dụ: EMB, MAC).

- Môi trường tăng sinh phải chứa đủ tryptophan. Không sử dụng thạch Mueller-Hinton để test vì tryptophan bị phá hủy trong khi thủy phân acid của casein.

- Chỉ sử dụng thuốc nhuộm cinnamaldehyde cho test nhỏ giọt đối với các vi khuẩn kỵ khí. Nó là thuốc thử nhạy hơn nhưng kém bền.

- Không sử dụng đĩa thạch có nitrat để thử test indole vì nitrate có thể gây Âm tính giả trong test nhỏ giọt indole.

- Nếu test nhanh indole Âm tính, một số vi khuẩn phân lập được có thể Dương tính với thử nghiệm trong ống nghiệm. Thử nghiệm bằng xylene là test nhạy nhất đảm bảo kết quả chính xác.

## **11. Lưu trữ hồ sơ**

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.

# THỬ NGHIỆM TRÊN MÔI TRƯỜNG THẠCH KIA

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện thử nghiệm trên môi trường thạch KIA xác định khả năng lên men carborhydrat, sinh hơi, sinh  $H_2S$  của vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.
- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Thạch KIA chứa 0,1% glucose, 1% lactose, chất chỉ thị đỏ phenol, gồm 2 phần đứng và nghiêng, phần thạch đứng cao khoảng 1,5 - 2cm không tiếp xúc với oxy, phần nghiêng tiếp xúc với oxy.

Những vi khuẩn lên men glucose mà không lên men lactose ban đầu sẽ tạo ra màu vàng ở phần nghiêng, do tạo ra acid từ lên men glucose. Một lượng nhỏ glucose sẽ bị cạn kiệt rất nhanh, sự chuyển hóa hiếu khí vẫn tiếp tục sẽ tạo ra kiềm từ việc chuyển hóa hiếu khí các peptone, phần nghiêng chuyển sang màu đỏ. Ở phía đáy ống, không có oxy, không có sự chuyển hóa hiếu khí nên ở đáy ống vẫn có màu vàng.

Những vi khuẩn lên men lactose: Sau khi sử dụng hết glucose, chúng tiếp tục lên men lactose, vẫn tiếp tục tạo ra màu vàng ở phần nghiêng và phần đáy ống nghiêng. Nếu ở phần đáy ống và phần nghiêng mà có màu trung gian giữa màu vàng và màu đỏ thì vi khuẩn đó không lên men cả hai loại đường.

Hơi sinh ra từ phản ứng lên men glucose sẽ đẩy thạch lên cao hơn.

$H_2S$  được sinh ra do phản ứng của Natri thiosulfat, kết hợp với ion Fe, tạo thành hợp chất có màu đen.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm

- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lamén bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### **b. Sinh phẩm hóa chất**

- Ống thạch nghiêng KIA hoặc TSI.
- Nước muối sinh lý 0,9%.

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Chứng:

<b>Chủng</b>	<b>KIA</b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>Sinh hơi</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	A/A	Không	Có
<i>Salmonella enterica</i> typhi ATCC 14028	K/A	Có	Có/Không
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	K/K	Không	Không
<i>Campylobacter hyointestinalis</i> ATCC 35217	K/K	Có	Không

## **7. An toàn**

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## **8. Nội dung thực hiện**

- Lấy ống thạch nghiêng KIA không nứt vỡ, không biến dạng, làm ấm hoặc để ở nhiệt độ phòng, ghi mã bệnh phẩm, ngày thực hiện xét nghiệm.

- Dùng que cấy vô trùng lấy 1 khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ, nghi ngờ.

- Cấy thẳng xuống ống thạch cách đáy ống KIA 3-5mm, kéo que cấy lên ria hết phần thạch nghiêng.

- Đối với vi khuẩn khó nuôi cấy, đặt một miếng giấy chì acetat lên miệng ống thạch.

- Đậy nắp ống thạch.

- Để vào tủ ấm 37°C trong 18-24 giờ.

- Quan sát phản ứng xảy ra ở đáy ống và phần phía trên ống thạch, quan sát sự sinh hơi, sinh H<sub>2</sub>S.

- Không đọc tính chất lên men đường sau 24 giờ, để ống thạch vào tủ lạnh nếu quá trình đọc bị trì hoãn.

- Nếu cần thiết, có thể ủ thêm nhưng chỉ với trường hợp xác định H<sub>2</sub>S. *Campylobacter* có thể sinh H<sub>2</sub>S ở ngày thứ 3.

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Phản ứng tạo acid: màu vàng

- Phản ứng tạo kiềm: màu đỏ

- Nếu vi khuẩn sinh H<sub>2</sub>S thì phần đáy ống có màu đen, có vòng màu đen ở chỗ giao giữa thạch nghiêng và đáy ống, hoặc miếng giấy chỉ acetat chuyển sang màu đen.

- Nếu vi khuẩn sinh hơi thấy thạch bị đẩy lên khỏi đáy ống, môi trường có bọt khí hoặc làm môi trường nứt.

- Quan sát sự lên men carbohydrate

- A/A: lên men glucose và lactose.

- K/A: chỉ lên men glucose

- K/K: không lên men carbohydrat.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Không đọc tính chất lên men đường trước 18 giờ.

- Lượng H<sub>2</sub>S sinh ra có thể che hết quá trình lên men glucose. Nếu xảy ra, tính chất lên men glucose đã được lên men nên được ghi nhận. Kiểm tra tính chất sinh hơi.

- Những thử nghiệm trên KIA không thể phân biệt tất cả các vi khuẩn từ phân ít lên men lactose.

- Những thử nghiệm trên KIA không phân biệt được *Salmonella* và *Citrobacter*.

- Thử nghiệm sinh hơi trên TSI tốt hơn trên KIA.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.



# THỬ NGHIỆM SINH PYR

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện thử nghiệm sinh PYR của vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

PYR là chất để phát hiện enzym pyrrolidonyl peptidase. Enzym peptidase thủy phân hidro của chất nền tạo ra  $\beta$ -naphthylamid, khi thêm cinnamaldehyd 0,01% vào, nếu xảy ra phản ứng thì sẽ tạo thành hợp chất có màu.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy nhọn, lam kính.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

- Khoang giấy PYR để ở 2-8°C /chỗ tối.
- Cinnamaldehyd 0,01%
- Nước muối sinh lý vô trùng 0,9%.
- Chủng vi khuẩn nghi ngờ

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Chứng:

+ Chứng Dương: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

+ Chứng Âm: *Escherichia coli* ATCC 25923

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.

- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Dùng panh gắp một khoanh PYR đặt vào đĩa petri.

- Làm ẩm khoanh giấy bằng nước vô trùng, nhưng không làm ướt.

- Dùng que cấy vô trùng lấy khuẩn lạc (khóm) đã nuôi cấy 24-48 giờ từ môi trường thạch máu.

- Phết khuẩn lạc (khóm) lên khoanh giấy.

- Phản ứng tạo màu đỏ xảy ra 2 - 10 phút.

- Nhỏ một giọt cinnamaldehyd 0,01% vào, quan sát sự thay đổi màu.

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Dương tính: phản ứng tạo màu hồng tươi, đồ đậm trong vòng 1 phút.

- Âm tính: không đổi màu, màu xanh hoặc màu hồng nhạt.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Thử nghiệm âm tính giả nếu khoanh PYR quá ẩm, hoặc lấy khuẩn lạc (khóm) trên các môi trường chọn lọc hoặc trong các ống thạch thử nghiệm tính chất sinh vật hóa học.

- Nếu kết quả yếu, nhạt màu trên khoanh giấy thử nghiệm với *Staphylococcus aureus*. Muốn khẳng định là dương tính cần làm các thử nghiệm khác hoặc làm trong ống PYR có trong một số kit định danh nhanh như API RAPID STREP.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.

# THỬ NGHIỆM OPTOCHIN

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện quy trình kiểm tra sự nhạy cảm của vi khuẩn với optochin.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

*Streptococcus pneumoniae* (phế cầu) là vi khuẩn hay gặp ở đường hô hấp, tính chất tan máu (tiêu huyết) không thể phân biệt được chúng với các loại cầu khuẩn và *Lactobacilli*. Xác định sự nhạy cảm với optochin có thể phân biệt được phế cầu và các cầu khuẩn tan máu (tiêu huyết)  $\alpha$  khác. Các vi khuẩn Gram dương, khuẩn lạc (khóm) giống phế cầu sẽ tạo ra một vòng ức chế rõ ràng xung quanh khoanh optochin, còn những loại vi khuẩn tan máu (tiêu huyết)  $\alpha$  khác thì không tạo vòng ức chế.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy nhọn, lam kính, lamên bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

- Khoanh giấy optochin
- Thạch 5% máu cừ.

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Chứng:

+ Chứng Dương: *Streptococcus pneumonia* ATCC 49619

+ Chứng Âm: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.

- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Thử nghiệm với khuẩn lạc (khóm) thuần nhất

+ Dùng que cấy lấy một khuẩn lạc (khóm) tan máu (tiêu huyết)  $\alpha$  riêng rẽ để ria trực tiếp hoặc pha huyền dịch vi khuẩn có độ đục 0,5 McFarland.

+ Dùng que cấy ria vi khuẩn hoặc tăm bông (que gòn) lấy huyền dịch vi khuẩn ria các đường sát nhau lên đĩa thạch máu, lặp lại ít nhất 2 lần.

+ Dùng panh vô khuẩn đặt một khoanh optochin lên bề mặt thạch máu.

+ Thử nghiệm từ bệnh phẩm.

+ Dùng que cấy vô trùng ria bệnh phẩm lên đĩa thạch máu.

+ Dùng panh vô khuẩn đặt một khoanh optochin vào rìa của vùng nguyên ủy.

- Ấn nhẹ panh xuống khoanh giấy để khoanh giấy bám chắc vào đĩa thạch.

- Để vào tủ ẩm 35 - 37°C với 5 -10% CO<sub>2</sub>, đọc kết quả sau 18-24 giờ.

- Nếu có đường kính vùng ức chế thì đo bằng thước chia mm hoặc đo bằng thước kẹp (caliper).

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Thử nghiệm dương tính (Nhạy cảm với optochin): Đường kính vùng ức chế  $\geq 14$ mm (15 đến 30mm).

- Nhạy cảm mức trung gian với optochin: Đường kính vùng ức chế  $< 14$ mm.

- Đề kháng với optochin: Không có vùng ức chế.

- Những khuẩn lạc (khóm) nằm trong vùng ức chế có thể là phế cầu hoặc không.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Những chủng thử nghiệm cho kết quả trung gian với Optochin có thể là phế cầu.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.

# THỬ NGHIỆM SINH OXIDASE

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện thử nghiệm phát hiện tính chất sinh oxidase.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Ở một số vi khuẩn, tế bào có enzym cytochrom oxidase. Khi có mặt oxy, enzym này có khả năng oxy hóa thuốc thử tetramethyl-p-phenylenediamine là chất nhận điện tử trong chuỗi hô hấp tế bào tạo thành indo phenol - một phức hợp có màu tím đậm.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng đậy (coverslip) bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

- Giấy lọc Whatman No 1, hoặc khoanh giấy đã có sẵn hóa chất oxidase.
- Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, 1% (thuốc thử Kovac) đựng trong lọ bọc giấy bạc tránh ánh sáng.
- Dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, 1% (thuốc thử Gordon và McLeod).
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0,9%.

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Chứng:

+ Chứng Dương: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

+ Chứng Âm: *Escherichia coli* ATCC 25922

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.

- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Phương pháp sử dụng miếng giấy lọc Whatman hoặc khoan giấy oxidase.

- Đặt một miếng giấy lọc Whatman vào đĩa petri, nhỏ 1 hoặc 2 giọt hóa chất oxidase. Nếu dùng khoan giấy oxidase thì làm ẩm bằng nước khử ion.

- Có thể lựa chọn một trong hai cách sau:

- Lấy một khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ trên môi trường nuôi cấy phết lên khoan giấy đã có hóa chất hoặc chạm khoan giấy đã có hóa chất vào khuẩn lạc (khóm) quan sát sự chuyển màu. Với vi khuẩn khó nuôi cấy thì dùng tăm bông (que gòn) trắng quệt khuẩn lạc (khóm) rồi chà vào giấy có hóa chất.

- Phương pháp làm trực tiếp trên đĩa nuôi cấy: Nhỏ hóa chất oxidase lên vài khuẩn lạc (khóm) nghi ngờ, không nhỏ ngập toàn bộ đĩa cấy vi khuẩn. Khi làm bằng phương pháp này, khuẩn lạc (khóm) mất màu rất nhanh, nên cần phải bắt khuẩn lạc (khóm) cấy chuyển ngay.

- Quan sát sự xuất hiện màu tím trên khuẩn lạc (khóm).

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Âm tính: Không thay đổi màu sắc trong 60 giây.

- Dương tính: xuất hiện phức hợp màu tím/xanh đậm sau 10-30 giây.

- Phản ứng Dương tính yếu: chuyển màu tím sau 30 - 60 giây (*Pasteurella* spp.).

- Không đọc kết quả sau 60 giây.

- Các vi khuẩn oxidase dương tính PVNCH:

+ P: *Pseudomonas* spp

+ V: *Vibrio* spp

+ N: *Neisseria* spp

- + C: *Campylobacter* spp
- + H: *Helicobacter* spp/*Haemophilus* spp.
- + *Aeromonas* spp
- + *Alcaligenes*

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Không dùng que cấy là hợp chất của Niken-crom để lấy khuẩn lạc (khóm).
- Phản ứng oxidase phải được tiến hành với những khuẩn lạc (khóm) ở môi trường không có glucose hoặc không có màu như MAC, TCBS,...
- Môi trường nuôi cấy mà có cả *Neisseria* và *Pseudomonas* sẽ dẫn đến hiện tượng Âm tính giả do *Pseudomonas* tạo ra chất ức chế sự sinh enzyme oxidase của *Neisseria*.
- Cần đọc đúng thời gian để đảm bảo kết quả chính xác.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.
- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.

## TÀI LIỆU LIÊN QUAN

1. Quy trình an toàn phòng xét nghiệm
2. Hướng dẫn bố trí phòng xét nghiệm vi sinh và các trang thiết bị sử dụng trong phòng xét nghiệm vi sinh
3. An toàn sinh học trong phòng xét nghiệm
4. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm vi sinh lâm sàng
5. Quy trình làm tiêu bản
6. Quy trình nhuộm Gram
7. Kỹ thuật cấy vào môi trường lỏng, ống thạch nghiêng, ống thạch mềm
8. Quy trình định danh các cầu khuẩn Gram âm
9. Quy trình định danh các trực khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae
10. Quy trình định danh các trực khuẩn thuộc họ non-Enterobacteriaceae

# THỬ NGHIỆM VỆ TINH

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện thử nghiệm “vệ tinh” của vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

*Haemophilus influenzae* (HI) cần yếu tố X (Hemin) và V (NAD) cho sự phát triển của chúng, nhưng một số loại *Haemophilus* khác chỉ cần yếu tố X. Yếu tố V được giải phóng từ hồng cầu vỡ. Thạch máu thỏ có yếu tố X, nhưng không có yếu tố V. HI có thể mọc gần khuẩn lạc (khóm) của cầu khuẩn những loài gây tan máu (tiêu huyết) giải phóng yếu tố X. Yếu tố X khuếch tán vào môi trường xung quanh kích thích sự phát triển của HI gần với khuẩn lạc (khóm) của cầu khuẩn.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lá kính mỏng đậy (coverslip) bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

### b. Sinh phẩm hóa chất

- Chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, hoặc *Staphylococcus epidermidis* không tan máu (tiêu huyết) và không có penicillinase.
- Môi trường thạch không chứa yếu tố X, V, XV
- NaCl 0,9%.
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0,9%.



## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

+ Chứng:

+ Chứng Dương: *Haemophilus influenza* ATCC 43065

## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.

- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

- Dùng que cấy vô trùng cấy chuyển khuẩn lạc (khóm) nghi ngờ sang đĩa thạch máu.

- Ria tụ cầu theo một đường vào đĩa thạch máu đã cấy chuyển.

- Để vào tủ ấm 35 - 37°C với 5% CO<sub>2</sub> trong 24 giờ.

- Kiểm tra đĩa thạch máu xem có các khuẩn lạc (khóm) vệ tinh mọc xung quanh đường cấy tụ cầu không.

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Dương tính: có khuẩn lạc (khóm) nhỏ mọc xung quanh đường cấy tụ cầu.

- Âm tính: mọc trên thạch nhưng không cần đường ria cấy tụ cầu, xuất hiện các khuẩn lạc (khóm) không tập trung xung quanh đường cấy tụ cầu hoặc không mọc trên thạch máu.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- *Haemophilus ducreyi* không cần yếu tố X, bản thân nó đã là một loại vi khuẩn khó nuôi cấy nên nó không mọc trên thạch máu ngay cả khi có đường ria tụ cầu.

- *Haemophilus hemolyticus* và *Haemophilus parahemolyticus* có thể mọc trên thạch máu mà không cần đường ria tụ cầu, không thể chứng minh test vệ tinh mặc dù chúng cần yếu tố X. Chúng là những vi khuẩn gây tan máu (tiêu huyết) nên chúng có thể giải phóng yếu tố X vào môi trường.

- *Brucella* có thể nhầm với *Haemophilus*. Cần thử nghiệm từng chi vì *Brucella* spp có thể mọc trên thạch máu mà không cần tụ cầu phải cung cấp yếu tố X.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.

# KỸ THUẬT CÂY CHUYỂN VI KHUẨN

## 1. Mục đích

Mô tả kỹ thuật cấy chuyển vi khuẩn từ môi trường này sang môi trường khác.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Người nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Nhân viên xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

- Cấy chuyển chủng vi khuẩn là kỹ thuật vô trùng, chuyển vi sinh vật từ môi trường đang nuôi cấy sang môi trường mới với nhiều mục đích khác nhau: lấy khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ, giữ chủng, lưu chủng,... để lưu giữ chủng, tùy loại vi khuẩn cần cấy chuyển định kỳ sau những khoảng thời gian khác nhau.

- Có 4 hình thức chính đối với cấy chuyển:

- + Cấy chuyển từ môi trường đặc sang môi trường đặc
- + Cấy chuyển từ môi trường đặc sang môi trường lỏng
- + Cấy chuyển từ môi trường lỏng sang môi trường đặc
- + Cấy chuyển từ môi trường lỏng sang môi trường lỏng.

## 5. Trang thiết bị, vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Đèn cồn, que cấy, lam kính, lamén, bút viết kính, dầu soi kính, giấy thấm dầu.
- Pipet Pasteur vô trùng.

## **b. Sinh phẩm hóa chất**

Các môi trường nuôi cấy cần thiết.

## **6. Kiểm tra chất lượng**

Các hóa chất được kiểm tra theo Quy trình kiểm tra chất lượng sinh phẩm, hóa chất, lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

## **7. An toàn**

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH.
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Chuẩn bị**

- Mặc áo bảo hộ, đội mũ, đeo khẩu trang, que cấy tay
- Chuẩn bị tủ sạch, que cấy, đèn cồn, đĩa thạch nghiêng ủ, ống, đĩa môi trường mới.
- Ghi các thông tin sau lên đĩa hoặc ống nuôi cấy mới: Mã bệnh phẩm, ngày cấy, tên chủng vi khuẩn.

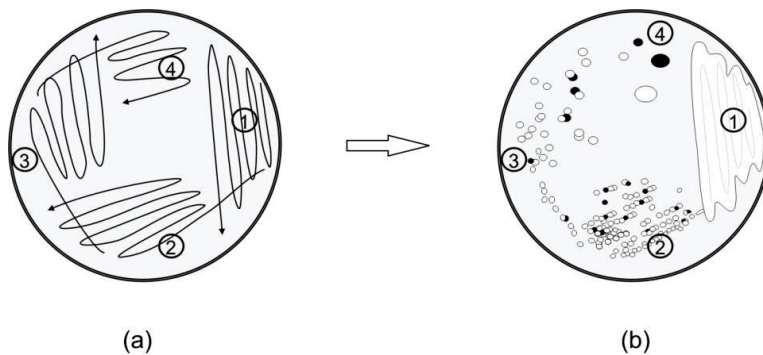
### **b. Cấy chuyển**

- Lấy khuẩn lạc (khóm):

+ Với khuẩn lạc (khóm) trên đĩa thạch: Dùng tay trái mở đĩa nuôi cấy một khoảng đủ để thao tác, dùng que cấy chạm vào chóp 1 khuẩn lạc (khóm) mọc riêng rẽ, rút que cấy ra, đậy nắp đĩa lại, giữ que cấy bằng tay phải.

+ Với khuẩn lạc (khóm) trên ống thạch nghiêng: Mở nắp ống, hơi miệng ống gần ngọn lửa đèn cồn, dùng que cấy lấy vi khuẩn mọc trên bề mặt thạch nghiêng, đậy nắp ống, giữ que cấy bằng tay phải.

- Cấy chuyển từ đĩa thạch hoặc ống thạch nghiêng sang đĩa thạch mới (dùng kỹ thuật cấy phân vùng).



**Hình 1. Đường cấy và khuẩn lạc (khóm)**

- Lấy đĩa môi trường mới (đĩa cấy chuyên), mở một khoảng vừa đủ để thao tác, giữ que cấy song song với mặt thạch, rìa vùng 1 (3-5 đường). Đốt que cấy và để nguội tự nhiên (Xem hình minh họa).

- Mở đĩa cấy chuyên, rìa vùng 2 từ vùng 1, rìa khoảng 3-5 đường. Đốt que cấy và để nguội tự nhiên.

- Mở đĩa cấy chuyên, rìa vùng 3 từ vùng 2, rìa khoảng 3-5 đường.

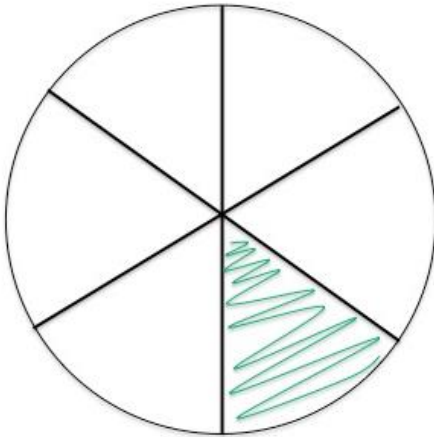
- Đốt que cấy và để nguội tự nhiên.

- Mở đĩa cấy chuyên, rìa vùng 4 từ vùng 3, rìa khoảng 3-5 đường, tránh chạm vào vùng 1.

- Đậy đĩa cấy chuyên, đốt que cấy và để đĩa vào tủ ấm trong điều kiện phù hợp.

**Chú ý:**

Người ta cũng có thể cấy trên đĩa thạch mới thành các vùng nhỏ để tăng sinh, hoặc cấy đếm trên đĩa thạch mới tùy vào mục đích.



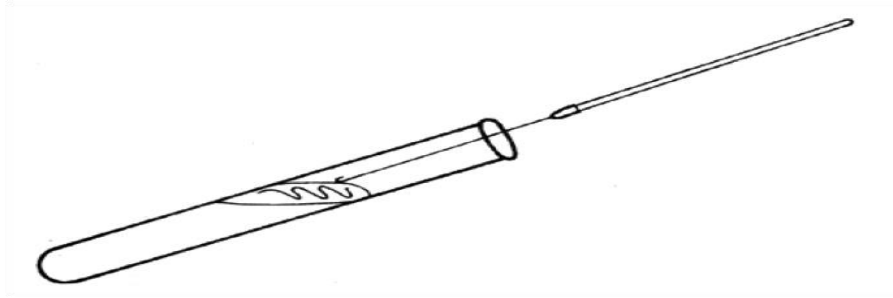
**Hình 2.** Cấy thành nhiều vùng trên đĩa thạch và khuẩn lạc (khóm)

- Cấy chuyên từ đĩa thạch hoặc ống thạch nghiêng sang ống thạch mới:

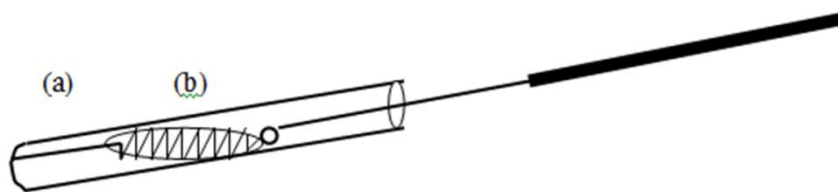
+ Mở nắp ống thạch nghiêng, hơi miệng ống gần ngọn lửa đèn cồn.

+ Đưa que cấy vào chỗ thấp nhất của mặt thạch, rìa trên mặt thạch nghiêng, vừa rìa vừa đưa dần que cấy lên cao đến hết mặt thạch. Có hai cách cấy trên thạch thường: chỉ cấy trên mặt thạch nghiêng và cấy cả phần đứng và phần nghiêng

+ Rút que cấy ra, hơi miệng ống gần ngọn lửa đèn cồn, đậy nắp.



Ria cấy khuẩn lạc (khóm) trên mặt thạch nghiêng



**Hình 3.** Cấy vào ống thạch nghiêng, phần đứng (a) và phần nghiêng (b)

- Cấy chuyển từ môi trường đặc sang môi trường lỏng.

+ Lấy khuẩn lạc (khóm).

+ Mở nắp ống môi trường nuôi cấy mới, hơi lửa miệng ống. Để nghiêng khoảng  $45^{\circ}$ .

+ Đưa que cấy cây vào thành môi trường nuôi cấy đối diện với môi trường lỏng ở khu vực sẽ có môi trường khi dựng thẳng ống (chú ý, trong quá trình đưa que cấy, không chạm vào thành hay miệng ống). Cũng có thể đưa đầu que cấy có vi khuẩn nhúng vào môi trường lỏng.

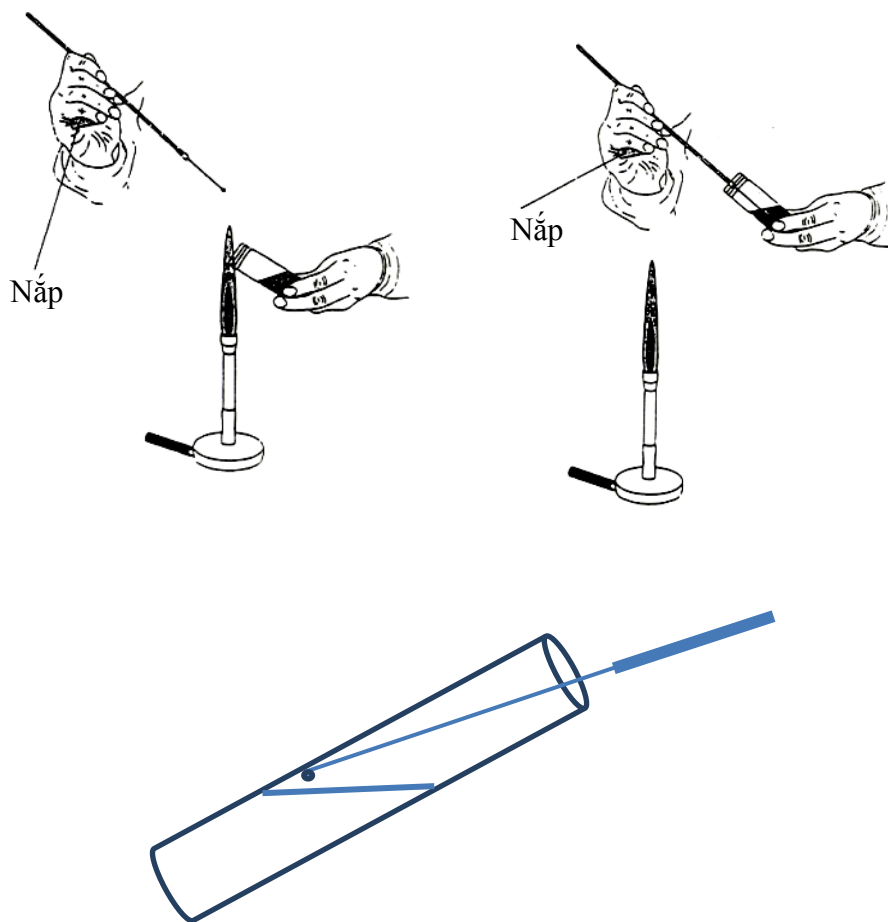
+ Nghiền que cấy vào thành ống cho vi khuẩn dính vào thành ống là được.

+ Hơi lửa miệng ống, đậy nắp và để ống nuôi cấy mới vào khay.

+ Đốt que cấy.

+ Kiểm tra lại các nắp ống đảm bảo đủ chặt (không quá chặt).

+ Đặt ống nuôi cấy vào môi trường thích hợp.



**Hình 4.** Cây vào môi trường lỏng

- Cây chuyển từ môi trường lỏng sang môi trường đặc:
- + Đốt và để que cây nguội tự nhiên, cầm que cây bằng tay phải (nếu thuận tay phải)
- + Cầm ống môi trường lỏng (chứa vi sinh vật), dùng ngón út tay phải kẹp nút bông hoặc nắp xoáy, mở ống.
- + Hơ miệng ống gần ngọn lửa đèn cồn.
- + Đưa que cây vào môi trường lỏng (đưa ống về phía que cây, không đưa que cây về phía ống), lấy một que cây dung dịch nuôi cấy (tùy thể tích), thao tác đưa que cây vào và rút que cây ra đều không chạm vào miệng hay thành ống.
- + Hơ lửa miệng ống, đậy nắp (di chuyển hoặc xoay ống chứa, không di chuyển nắp ống).
- + Để ống nuôi cấy vi sinh vật vào khay.
- + Lấy đĩa môi trường mới (đĩa cây chuyển), mở một khoảng vừa đủ để thao tác, giữ que cây song song với mặt thạch, ria vùng 1 (3-5 đường) (Xem hình 1).
- + Đốt que cây và để nguội tự nhiên.

- + Mở đĩa cây chuyển, ria vùng 2 từ vùng 1, ria khoảng 3-5 đường.
- + Đốt que cây và để nguội tự nhiên.
- + Mở đĩa cây chuyển, ria vùng 3 từ vùng 2, ria khoảng 3-5 đường.
- + Đốt que cây và để nguội tự nhiên.
- + Mở đĩa cây chuyển, ria vùng 4 từ vùng 3, ria khoảng 3-5 đường, tránh chạm vào vùng 1.
- + Đẩy đĩa cây chuyển lại, đốt que cây.
- Cây chuyển từ môi trường lỏng sang môi trường lỏng (Xem hình 4):
- + Đốt và để que cây nguội tự nhiên, cầm que cây bằng tay phải
- + Cầm ống nguyên ủy bằng tay trái, dùng ngón út tay phải mở nắp ống nguyên ủy (Di chuyển ống, không di chuyển tay cầm nắp ống), hơ lửa miệng ống
- + Đưa que cây vào môi trường lỏng chứa vi sinh vật (đưa ống về phía que cây, không đưa que cây về phía ống), lấy một que cây dung dịch nuôi cấy (tùy thể tích), thao tác đưa que cây vào và rút que cây ra đều không chạm vào miệng hay thành ống.
- + Hơ lửa miệng ống, đẩy nắp (di chuyển hoặc xoay ống chứa, không di chuyển nắp ống), đặt ống vào khay.
- + Mở nắp ống môi trường nuôi cấy mới, hơ lửa miệng ống.
- + Đưa que cây cấy vào trong môi trường nuôi cấy, không chạm vào thành hay miệng ống.
- + Hơ lửa miệng ống, đẩy nắp và để ống nuôi cấy mới vào khay.
- Đặt các môi trường vào tủ ấm 37°C, thời gian thích hợp.

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Tùy mục đích, nếu cây để có khuẩn lạc (khóm) thì khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ mọc trên môi trường đặc là đạt yêu cầu.
- Trên môi trường lỏng, vi khuẩn mọc làm đục môi trường.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Đảm bảo không bị lây nhiễm.
- Đảm bảo có khuẩn lạc (khóm), hoặc khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ trên môi trường đặc hoặc môi trường lỏng đục.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu tiến trình nuôi cấy vi khuẩn.
- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy trình lưu trữ hồ sơ.

# KỸ THUẬT LƯU GIỮ CHỦNG

## 1. Mục đích

Quy trình này mô tả/hướng dẫn thực hiện quy trình lưu giữ chủng vi khuẩn.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này được áp dụng ở Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của các Bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc: Không áp dụng

## 5. Trang thiết bị, vật tư

- Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm
- Máy trộn, lắc
- Ống vô trùng có nắp đậy.
- Pipet Pasteur vô trùng
- Tủ lạnh, tủ -20°C, tủ -80°C, bình ni-tơ lỏng, máy làm đông khô.
- Ống hộp lưu giữ chủng

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các loại hóa chất, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

- Các môi trường nuôi cấy cần được kiểm tra hàng tuần, mỗi lô mới lưu lại kết quả sau khi kiểm tra.

- Kiểm tra bằng các chủng chuẩn ATCC.



## 7. An toàn

- Thực hiện thao tác với mẫu bệnh phẩm trong tủ ATSH cấp II.
- Sử dụng các thiết bị bảo hộ cá nhân.

## 8. Nội dung thực hiện

### a. Cấy chuyển

- Là phương pháp bảo quản vi khuẩn kinh điển, dùng các môi trường mới cấy chuyển định kỳ, thời gian tùy thuộc chủng vi khuẩn.

- Áp dụng cho các chủng mẫu cần cho các thử nghiệm hàng ngày.
- Các bước tiến hành:

+ Xác định môi trường nuôi cấy phù hợp, nhiệt độ giữ chủng tối ưu, thời gian giữa các lần cấy chuyển.

+ Lấy chủng lưu trữ từ tủ lưu giữ ra (thường là tủ có nhiệt độ âm sâu). Dùng que cấy vô trùng lấy chủng (khi ống giữ chủng vẫn còn đông đá trước khi tan băng), cấy vào môi trường thích hợp và để trong điều kiện phù hợp (nhiệt độ, độ ẩm, thời gian).

+ Các chủng sau khi mọc được bảo quản ở nhiệt độ phòng, hoặc ở 2-8°C (tùy yêu cầu và mục đích sử dụng) và cấy chuyển hàng tuần. Chuẩn bị chủng làm việc mới ít nhất 1 tháng 1 lần (tùy loại).

+ Cấy chuyển lại theo lịch, mỗi lần cấy chuyển kiểm tra các đặc tính sinh học của chủng vi khuẩn để phát hiện thay đổi hoặc chủng bị nhiễm (nếu có).

- Chú ý: Trước khi tiến hành các thử nghiệm, cấy chuyển chủng lên đĩa thạch để thu được khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ. Đối với chủng đã đông băng, cấy chuyển chủng 2 lần trước khi tiến hành các thử nghiệm.

### b. Giữ chủng trong glycerol ở -20°C

- Dùng 2 ống cryotube có chứa 1-2ml glycerol trung tính vô trùng.
- Nuôi cấy chủng thuần nhất ở môi trường đặc.
- Lấy 1 que cấy khuẩn lạc (khóm) nghiền vào ống có chứa glycerol.
- Để ở tủ -20°C, tránh đông và tan băng nhiều lần.
- Cấy chuyển sau 12 - 18 tháng.

### c. Giữ chủng trong dầu khoáng để ở nhiệt độ phòng

- Tiệt trùng 5ml dầu khoáng trong ống thủy tinh Pyrex (18 x 150mm) có nắp kín bằng kim loại hoặc các dụng cụ chịu nhiệt khác, ở nhiệt độ 180°C trong 2 giờ trong tủ sấy khô.

- Kiểm tra sự vô trùng của dầu khoáng bằng cách cấy thử dầu ra một số môi trường phù hợp cho các vi khuẩn thông thường như thạch thường hoặc thạch máu.

- Nuôi cấy vi khuẩn theo phương pháp thông thường (thạch nghiêng, thạch mềm hoặc canh thang) để vi khuẩn phát triển đến giai đoạn tăng sinh theo hàm số mũ (tùy theo từng loại vi khuẩn, khoảng 6-18 giờ sau khi nuôi cấy), sau đó cho dầu khoáng đã tiệt trùng vào phủ kín bề mặt môi trường và dày ít nhất 2cm.

- Giữ các môi trường ở tư thế thẳng đứng trong tủ lạnh, cấy chuyển 6 - 12 tháng kiểm tra khả năng sống sót của vi khuẩn.

- Dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn từ môi trường giữ chủng, đặt nhẹ đầu que cấy lên mảnh giấy thấm vô trùng để hút dầu đi, sau đó cấy chuyển như thông thường.

#### **d. Cấy xuyên sâu (stab culture)**

- Dùng thạch TSA cho những chủng dễ nuôi cấy như *Staphylococci* và *Enterobacteriaceae*, CTA đối với giữ chủng *Neisseria* và *Streptococci*.

- Sử dụng những ống có nắp vặn, đáy sâu chứa môi trường thạch phù hợp.

- Dùng que cấy, lấy khuẩn lạc (khóm) cắm vào ống thạch.

- Ủ qua đêm ở 35°C.

- Đậy nắp ống thạch. Nếu dùng ống loại nắp đậy, cần phải bọc paraffin.

- Để ở nhiệt độ phòng, cấy chuyển sau 1 năm với *Staphylococci* và *Enterobacteriaceae*.

- Đối với *Nesseria* giữ ở 35°C, cấy chuyển mỗi 2 tuần.

- Streptococci giữ ở nhiệt độ phòng, cấy chuyển hàng tháng.

#### **e. Môi trường cook-meat giữ chủng vi khuẩn kỵ khí**

- Sử dụng những ống có nắp chứa môi trường.

- Dùng que cấy vô trùng lấy khuẩn lạc (khóm) đã phân lập nghiền vào môi trường.

- Ủ qua đêm ở 35°C.

- Đậy nắp.

- Giữ ở nhiệt độ phòng, cấy chuyển mỗi 2 tháng.

#### **f. Làm khô**

- Chủ yếu để giữ nha bào và một số loại vi khuẩn đặc biệt.

- Làm khô bằng giấy thấm: đặt các khoan giấy vô trùng vào một đĩa petri vô trùng, thêm huyền dịch vi khuẩn ( $10^8$  tế bào/ml) vào các khoan giấy cho đến khi khoan giấy bão hòa. Làm khô khoan giấy bằng hút chân không, sau đó cất các khoan giấy khô trong tủ lạnh.

- Gelatin: Pha canh thang vi khuẩn vào gelatin đang nóng chảy ( $30^{\circ}$ ) sao cho nồng độ vi khuẩn khoảng  $10^8$ - $10^9$  tế bào/ml. Dùng pipet Pasteur vô trùng hút huyền dịch vi khuẩn nhỏ lên đáy một đĩa Petri vô trùng. Đặt đĩa Petri này vào bình hút ẩm chân không. Khi gelatin đã khô, dùng panh vô trùng gấp vào ống (hoặc lọ) vô trùng, nắp kín (chống ẩm) rồi cất trong tủ lạnh hoặc tủ lạnh sâu.

- Silica gel: Cho các hạt silica gel vào ống nghiệm (hoặc lọ), tiệt trùng trong lò sấy khô ( $180^{\circ}\text{C}$  /2 giờ), pha khuẩn lạc (khóm) vào dung dịch skim milk 10% sau đó cho vào ống chứa silica gel, giữ ở  $0^{\circ}\text{C}$  trong khoảng 10 phút. Đặt các ống này vào bình hút ẩm có chứa silica gel khô khác, giữ như vậy ở nhiệt độ phòng trong 1 tuần hoặc ở  $25^{\circ}\text{C}$  trong 2 ngày. Cuối cùng, nắp chặt các ống lại và giữ trong bình chống ẩm.

### **g. Đông khô**

- Nguyên tắc: Đông khô là quá trình làm mất nước trong huyền dịch vi khuẩn đã đông lạnh bằng cách làm cho chúng bay hơi dưới áp lực âm (nước bốc hơi không qua pha lỏng). Các tế bào đông khô có thể sống được trong thời gian rất dài nếu không cho chúng tiếp xúc với oxy, ẩm và ánh sáng. Chúng có thể lấy ra dùng bất cứ lúc nào bằng cách hòa vào môi trường phù hợp.

- Sau khi đông khô vi khuẩn, bảo quản ở  $2$ - $8^{\circ}\text{C}$  tránh ánh sáng có thể giữ được chủng trên 30 năm mà không biến đổi đặc tính của chủng, bảo quản ở nhiệt độ  $-70$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  giữ được lâu hơn.

### **h. Siêu lạnh**

- Bảo quản trong ni-tơ lỏng ở  $-196^{\circ}\text{C}$  hoặc bảo quản trong pha khí của dung dịch nitrogen.

- Phương pháp này giúp bảo quản chủng trong 10 - 30 năm.

## **9. Diễn giải kết quả và báo cáo**

### **10. Lưu ý (cảnh báo)**

- Giữ vi khuẩn ở ngăn đá tủ lạnh thường hoặc trong giàn lạnh, hiệu quả thay đổi tùy loại vi khuẩn 2 - 3 tuần với vi khuẩn, 3 - 4 tháng với nấm.

- Giữ vi khuẩn ở lạnh sâu ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) thời gian giữ lâu hơn.

- Không bảo quản chủng đông khô trong ni-tơ lỏng.

### **11. Lưu trữ hồ sơ**

- Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ lưu chủng.

- Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.



## **Chương II**

# **QUY TRÌNH NUÔI CẤY PHÂN LẬP VI KHUẨN TỪ BỆNH PHẨM**

## **QUY TRÌNH CẤY MÁU BẰNG PHƯƠNG PHÁP THÔNG THƯỜNG**

### **1. Mục đích**

Hướng dẫn các bước tiến hành lấy máu, nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm máu bằng phương pháp thông thường.

### **2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình này áp dụng cho Khoa/ Phòng/ Bộ phận xét nghiệm Vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện.

### **3. Trách nhiệm**

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận của chuyên ngành Vi sinh Y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh Y học.

### **4. Nguyên tắc**

- Canh thang BHI là môi trường lỏng, giàu chất dinh dưỡng để tăng sinh cho cả vi khuẩn hiếu khí và yếm khí khó mọc. Nếu có sự phát triển của vi khuẩn, chúng sẽ làm thay đổi môi trường canh thang và được quan sát bằng mắt thường.

- Vi khuẩn trong canh thang sẽ được cấy chuyển sang môi trường đặc. Kỹ thuật nuôi cấy, phân lập và định danh kinh điển sử dụng các môi trường thạch đĩa giàu chất dinh dưỡng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn gây bệnh. Các vi khuẩn gây bệnh được định danh dựa vào các đặc điểm về hình thái học, nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

### **5. Trang thiết bị và vật tư**

#### **a. Trang thiết bị**

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường 35 - 37°C
- Tủ ấm CO<sub>2</sub>/ hoặc các thiết bị tạo CO<sub>2</sub>
- Tủ ấm 25 - 30°C

## **b. Dụng cụ**

- Bơm, kim tiêm vô trùng
- Bông thấm vô trùng
- Dây garo
- Cồn sát trùng
- Que cấy
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

## **c. Vật liệu**

### **Môi trường nuôi cấy:**

- Thạch máu (BA)
- Thạch Socola (CA)
- Thạch Sabouraud (SAB)
- Thạch Chromagar

### **Hóa chất:**

Bộ thuốc nhuộm Gram

### **Các chủng quốc tế ATCC:**

Các chủng chuẩn quốc tế ATCC để kiểm tra chất lượng môi trường, hóa chất, sinh phẩm, bình cấy máu.

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

## **7. An toàn**

- Áp dụng các biện pháp an toàn sinh học cấp II khi xử lý bệnh phẩm và thực hiện xét nghiệm.

- Tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm.

- Sử dụng tủ an toàn sinh học cấp II để tránh nhiễm bẩn và bảo vệ cho nhân viên.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm**

Bệnh phẩm được lấy, vận chuyển và bảo quản theo quy định của Khoa/ Phòng/ Bộ phận xét nghiệm vi sinh.

- Thời điểm: Lấy máu khi bệnh nhân bắt đầu sốt cao, trước khi có biểu hiện rét run, không được chậm trễ vì theo thời gian lượng vi khuẩn trong máu sẽ giảm xuống sau khi bệnh nhân hạ sốt.

- Kỹ thuật lấy máu:

+ Chọn tĩnh mạch, buộc garô.

+ Sát trùng da bằng cách xoay tròn bông sát trùng từ tâm ra ngoài. Sử dụng cồn 70% và iodine 2% (1 phút) hoặc providone iodine (2 phút).

+ Để khô 1 - 2 phút.

+ Lấy máu bằng bơm tiêm vô trùng.

+ Bơm nhẹ máu chảy dọc theo thành bình cấy máu.

+ Không lắc mạnh, tránh vỡ hồng cầu.

+ Tháo garô, sát trùng da lại.

- Số lần cấy máu:

+ Có thể lấy 2 mẫu máu ở 2 vị trí, cùng thời điểm: 1 bình cấy máu hiếu khí và 1 bình cấy máu kỵ khí.

+ Có thể lấy 2 mẫu máu ở 1 vị trí, cùng thời điểm.

+ Có thể lấy máu nhiều lần trong 1 ngày (ví dụ bệnh Osler).

+ Có thể lấy máu nhiều ngày liên tiếp.

+ Không nên cấy máu 1 lần.

- Dụng cụ chứa: Bình cấy máu tự pha.

- Thể tích: Tỷ lệ thể tích máu/ môi trường là 1/ 5.

+ Người lớn lấy khoảng 8-10 ml máu/1 bình 50 ml canh thang.

+ Trẻ em lấy khoảng 1-3 ml máu /1 bình 30 ml canh thang.

- Vận chuyển: Gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt.

- Bảo quản: Có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng nhưng không quá 4 tiếng. Tuyệt đối không được bảo quản trong tủ lạnh.

### **b. Tiếp nhận bệnh phẩm**

- Quan sát tình trạng của bình cấy máu.

- Quan sát điều kiện bảo quản và thời gian vận chuyển phù hợp.

- Đối chiếu các thông tin trên phiếu chỉ định xét nghiệm và bình cấy máu. Bổ sung phần còn thiếu (nếu có) vào phiếu yêu cầu. Thông tin về chẩn đoán bệnh giúp xử lý bệnh phẩm tốt hơn.

### **c. Các tiêu chí từ chối bệnh phẩm**

Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định.

### **d. Các bước thực hiện**

#### **Ủ ấm bình cấy máu trong điều kiện:**

- Nhiệt độ: 35 - 37°C
- Khí trường: Bình thường.
- Thời gian: 1 - 7 ngày.

#### **Quan sát bình cấy máu:**

Hàng ngày quan sát bình cấy máu. Nếu có sự phát triển của vi sinh vật, chúng sẽ làm thay đổi môi trường canh thang và được quan sát bằng mắt thường.

#### **Nhận định sơ bộ vi sinh vật phát triển trong bình canh thang:**

- *Staphylococcus aureus* thường mọc thành hạt nhỏ đều và có màng dù ở bề mặt.
- *Streptococci* thường mọc lắng cặn ở đáy, thành bình như những cục bông hoặc mẫu bánh vụn.
- Các trực khuẩn Gram âm khi mọc làm canh thang đục đều (trừ *Salmonella* canh thang vẫn có thể trong, vi khuẩn tạo thành một lớp trắng bên trên đáy bình).
- *Pseudomonas* spp. mọc có váng như váng dừa, canh thang đục, đôi khi có bọt.

#### **Cấy chuyển bình cấy máu dương tính và ủ ấm:**

- Lắc đều bình canh thang.
- Dùng bơm tiêm hút khoảng 0,5 mL canh thang.
- Nhỏ 1 giọt máu lên lam kính sạch, để khô, cố định rồi nhuộm Gram. Nhận định sơ bộ hình thái, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn.
- Cấy chuyển máu sang môi trường BA, CA, SAB và chrom agar. Dùng que cấy vô trùng ria đều khắp bề mặt thạch để tạo khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ.

#### **- Ủ ấm:**

- + Ủ ấm môi trường BA, CA ở nhiệt độ 35 - 37°C trong tủ ấm CO<sub>2</sub>/ qua đêm.
- + Ủ ấm môi trường chromagar ở nhiệt độ 35 - 37°C trong tủ ấm thường/ qua đêm.
- + Ủ ấm thạch SAB ở tủ ấm 25-30°C/ qua đêm

#### **Cấy chuyển “mù” bình cấy máu âm tính sau ủ ấm 4-7 ngày**

- Lắc đều bình canh thang.



- Dùng bơm tiêm hút khoảng 0,5 mL canh thang.
- Cây chuyển máu sang môi trường BA, CA. Dùng que cấy vô trùng ria đều khắp bề mặt thạch.

- Ủ ấm thạch BA, CA ở nhiệt độ 35 - 37°C trong tủ ấm CO<sub>2</sub>/ qua đêm.

#### **Đọc đĩa thạch sau ủ ấm:**

- Quan sát bằng mắt thường sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ trên tất cả các đĩa và canh thang.

- Nếu thấy vi sinh vật phát triển:

+ Thông báo ngay cho bác sĩ về kết quả chẩn đoán sơ bộ vi sinh vật dựa vào kết quả nhuộm Gram và hình thái khuẩn lạc (khóm).

+ Tiến hành định danh vi sinh vật.

- Nếu không thấy vi sinh vật phát triển, tiến hành nhuộm Gram lại bình cấy máu để định hướng tìm nguyên nhân và khắc phục.

#### **Định danh vi khuẩn và thực hiện kháng sinh đồ:**

- Định danh tất cả các vi sinh vật phát triển trên môi trường. Xác định chi và loài của các tác nhân gây bệnh trong vòng 2 giờ sau khi quan sát thấy khuẩn lạc (khóm):

+ Nhuộm Gram khuẩn lạc (khóm).

+ Quan sát hình thái khuẩn lạc (khóm).

+ Xác định tính chất sinh vật hóa học của vi sinh vật bằng bộ sinh vật hóa học, máy định danh tự động/Hoặc định danh vi sinh vật bằng máy định danh khối phổ.

+ Thực hiện kháng sinh đồ đối với vi khuẩn/vi nấm gây bệnh.

#### **Đọc kết quả:**

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn/vi nấm gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn/ vi nấm đến mức độ chi và/hoặc loài.

- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn/ vi nấm gây bệnh.

#### **Các vi khuẩn gây nhiễm khuẩn huyết thường gặp:**

- Vi khuẩn Gram âm:

+ *Escherichia coli*

+ *Klebsiella pneumoniae*

+ *Acinetobacter baumannii*

+ *Burkholderia cepacia*

+ *Pseudomonas aeruginosa*

+ *Burkholderia pseudomallei*

- + *Salmonella*
- Vi khuẩn Gram dương:
- + *Staphylococcus aureus*
- + *Streptococcus viridans*
- + *Enterococcus spp.*
- + *Staphylococcus, coagulase negative*
- + *Streptococcus suis*
- + *Streptococcus, Group D (non-Enterococci)*

### **Lưu giữ đĩa môi trường và vi khuẩn nuôi cấy dương tính:**

- Lưu giữ các bình cấy máu, đĩa môi trường nuôi cấy dương tính theo qui định của khoa/ Phòng/ Bộ phận Vi sinh.
- Lưu giữ lâu dài các chủng phân lập được trong tủ lạnh âm sâu.

## **9. Báo cáo kết quả**

### **a. Báo cáo kết quả cấy máu dương tính**

- Báo cáo kết quả nhuộm Gram từ canh thang cấy máu Dương tính càng sớm càng tốt, thường là trong vòng 1 tiếng sau khi chai cấy máu Dương tính. Sự có mặt của bất kỳ loại vi khuẩn/vi nấm nào đều có ý nghĩa.

- Báo cáo kết quả nuôi cấy sơ bộ chi và loài càng sớm càng tốt trong khi tiếp tục tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

- Báo cáo kết quả định danh vi khuẩn/vi nấm đến mức độ chi và/hoặc loài theo đúng qui định.

+ Cấy máu 1 lần Dương tính với loài vi khuẩn gây bệnh thường gặp sẽ được coi là tác nhân gây nhiễm khuẩn huyết.

+ Cấy máu  $\geq 2$  lần dương tính với loài vi khuẩn gây bệnh ít gặp như các vi khuẩn *Staphylococci coagulase âm*, *Corynebacteria*, *Bacillus...* có trên da và trong môi trường vẫn được coi là tác nhân gây nhiễm khuẩn huyết.

### **b. Báo cáo kết quả cấy máu âm tính**

- Sau ủ ấm 4 ngày nếu không thấy dấu hiệu nghi ngờ có vi khuẩn mọc, trả lời kết quả sơ bộ là “Kết quả sơ bộ cấy máu Âm tính sau 4 ngày nuôi cấy”.

- Sau ủ ấm 7 ngày máy báo kết quả âm tính, trả lời kết quả cuối cùng là “Kết quả cấy máu Âm tính sau 7 ngày nuôi cấy”.

### **c. Báo cáo kết quả cấy máu nhiễm bản**

Những trường hợp cấy máu 1 lần Dương tính với các vi khuẩn vi hệ trên da, trong môi trường như:

- *Staphylococci coagulase* âm
- *Corynebacteria*
- *Bacillus* spp.
- *Propionibacterium* spp.
- *Streptococcus viridans*
- *Lactobacillus* spp.

## 10. Diễn giải kết quả

- Báo cáo kết quả cấy máu Dương tính nghĩa là bệnh nhân được coi là nhiễm khuẩn huyết.

- Nhiễm khuẩn huyết đa tác nhân có thể xảy ra. Cần kiểm tra lại các bước của quy trình và đối chiếu với lâm sàng.

## 11. Hạn chế

- Nồng độ vi khuẩn trong máu thấp nên không phát hiện được.
- Bệnh nhân đã điều trị kháng sinh từ trước.
- Số lượng máu lấy quá ít, không đủ để vi khuẩn phát triển.
- Môi trường nuôi cấy không phù hợp để phát hiện các vi khuẩn đặc biệt.
- Một số bệnh có triệu chứng giống như nhiễm khuẩn huyết, có nhiều trường hợp gây sốt chưa rõ nguyên nhân.
- Một số vi khuẩn khó mọc gây nhiễm khuẩn huyết nhưng không phát triển được trong môi trường nuôi cấy thông thường.

## 12. Lưu ý (cảnh báo)

- Quy trình này chỉ áp dụng để nuôi cấy vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ mọc, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả Âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.

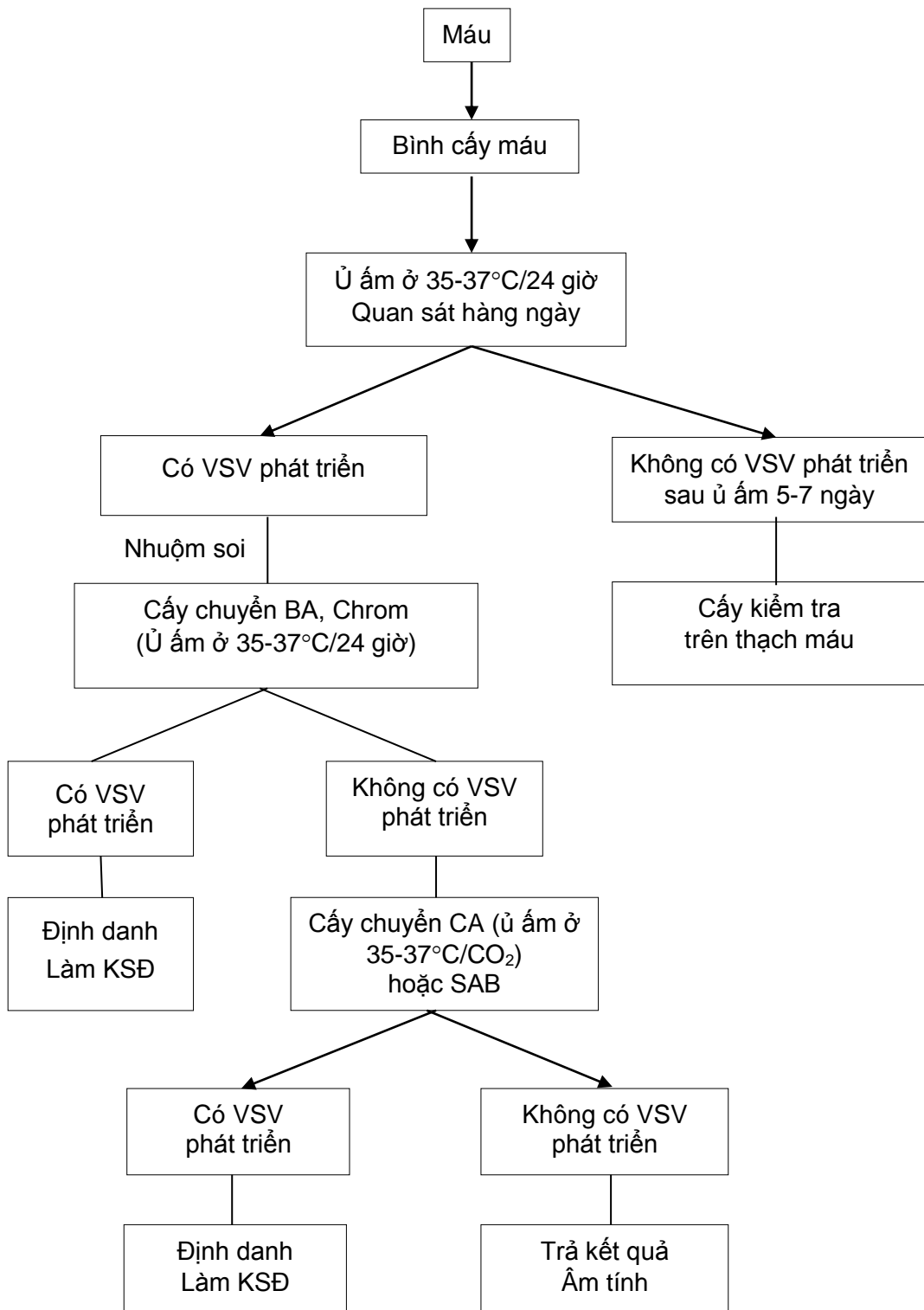
- Nếu bác sỹ lâm sàng có yêu cầu tìm vi khuẩn gây bệnh hiếm gặp, vi nấm gây bệnh phải ghi cụ thể để tránh bỏ sót.

- Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng yêu cầu có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc Dương tính giả.

## 13. Lưu trữ hồ sơ

Tất cả hồ sơ được lưu trữ theo qui định phù hợp với Khoa/ Phòng / Bộ phận vi sinh của từng bệnh viện.

## Sơ đồ quy trình cấy máu bằng phương pháp thông thường



# QUY TRÌNH CÂY MÁU BẰNG MÁY CÂY MÁU TỰ ĐỘNG

## 1. Mục đích

Hướng dẫn các bước tiến hành lấy máu, nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm máu bằng máy cây máu tự động.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này áp dụng cho Khoa/Phòng/ Bộ phận xét nghiệm Vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận của chuyên ngành Vi sinh Y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh Y học.

## 4. Nguyên tắc

- Chai cây máu được theo dõi hàng ngày nhờ hệ thống máy cây máu tự động ủ và lắc liên tục. Máy cây máu sử dụng đèn huỳnh quang trong máy quét 10 phút/lần vào lớp màng ở đáy chai để phát hiện nồng độ CO<sub>2</sub> hoặc sử dụng bộ phận cảm ứng đo màu và ánh sáng phản chiếu để phát hiện nồng độ CO<sub>2</sub> hòa tan trong môi trường nuôi cấy. Khi vi sinh vật phát triển trong chai cây máu, CO<sub>2</sub> sẽ được sản sinh. Bộ phận cảm nhận ở đáy chai cây máu có khả năng hấp thụ khí CO<sub>2</sub>, sẽ chuyển từ màu xanh sẫm sang màu vàng. Máy cây máu sẽ cảm nhận được thay đổi của phản chiếu qua sự đổi màu từ sẫm sang nhạt. Máy cây máu sẽ quét và ghi lại sự thay đổi này 10 phút/lần.

- Kỹ thuật nuôi cấy, phân lập và định danh kinh điển sử dụng các môi trường lỏng như canh thang BHI và các môi trường thạch đĩa giàu chất dinh dưỡng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn gây bệnh. Các vi khuẩn gây bệnh được định danh dựa vào các đặc điểm về hình thái học, nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường 35 - 37°C
- Tủ ấm CO<sub>2</sub>/hoặc các thiết bị tạo CO<sub>2</sub>

- Tủ ẩm 25 - 30°C
- Máy cấy máu tự động

### **b. Dụng cụ**

- Bơm, kim tiêm vô trùng
- Bông thấm vô trùng
- Dây garo
- Cồn sát trùng
- Que cấy
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

### **c. Vật liệu**

*Môi trường nuôi cấy:*

- Chai cấy máu nuôi cấy vi khuẩn hiếu khí dùng cho người lớn
- Chai cấy máu nuôi cấy vi khuẩn hiếu khí dùng cho trẻ em
- Chai cấy máu nuôi cấy vi nấm
- Chai cấy máu nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí
- Thạch máu (BA)
- Thạch Socola (CA)
- Thạch Sabouraud (SAB)
- Thạch Chromagar

*Hóa chất:*

Bộ thuốc nhuộm Gram

*Các chủng quốc tế ATCC:*

Các chủng chuẩn quốc tế ATCC để kiểm tra chất lượng môi trường, hóa chất, sinh phẩm, chai cấy máu.

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

- Các loại chai cấy máu, sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

## 7. An toàn

- Áp dụng các biện pháp an toàn sinh học cấp II khi xử lý bệnh phẩm và thực hiện xét nghiệm.
- Tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm.
- Sử dụng tủ an toàn sinh học cấp II để tránh nhiễm bẩn và bảo vệ cho nhân viên.

## 8. Nội dung thực hiện

### a. Chuẩn bị

*Lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm:*

Bệnh phẩm được lấy, vận chuyển và bảo quản theo quy định của Khoa/Phòng/Bộ phận xét nghiệm vi sinh.

- Thời điểm: Lấy máu khi bệnh nhân bắt đầu sốt cao, trước khi có biểu hiện rét run, không được chậm trễ vì theo thời gian lượng vi khuẩn trong máu sẽ giảm xuống sau khi bệnh nhân hạ sốt.

- Kỹ thuật lấy máu:

+ Chọn tĩnh mạch, buộc garô.

+ Sát trùng da bằng cách xoay tròn bông sát trùng từ tâm ra ngoài. Sử dụng cồn 70% và iodine 2% (1 phút) hoặc providone iodine (2 phút).

+ Để khô 1 - 2 phút.

+ Lấy máu bằng bơm tiêm vô trùng.

+ Bơm nhẹ máu chảy dọc theo thành chai cấy máu.

+ Không lắc mạnh, tránh vỡ hồng cầu.

+ Tháo garô, sát trùng da lại.

- Số lần cấy máu:

+ Có thể lấy 2 mẫu máu ở 2 vị trí, cùng thời điểm: 1 chai cấy máu hiếu khí và 1 chai cấy máu kỵ khí.

+ Có thể lấy 2 mẫu máu ở 1 vị trí, cùng thời điểm: 1 chai cấy máu hiếu khí và 1 chai cấy máu kỵ khí.

+ Có thể lấy máu nhiều lần trong 1 ngày (ví dụ bệnh Osler).

+ Có thể lấy máu nhiều ngày liên tiếp.

+ Không nên cấy máu 1 lần. Nếu bắt buộc phải cấy máu 1 lần nên sử dụng chai cấy máu hiếu khí.

- Dụng cụ chứa: Chai cấy máu thương mại.

- Thể tích: Tỷ lệ thể tích máu/môi trường là 1/5.
- + Người lớn lấy khoảng 8-10 ml máu/1 chai 50 ml canh thang.
- + Trẻ em lấy khoảng 1-3 ml máu /1 chai 30 ml canh thang.
- Vận chuyển: Gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt.
- Bảo quản: Có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng nhưng không quá 4 tiếng. Tuyệt đối không được bảo quản trong tủ lạnh.

*Tiếp nhận bệnh phẩm:*

- Quan sát tình trạng của chai cấy máu.
- Quan sát điều kiện bảo quản và thời gian vận chuyển phù hợp.
- Đối chiếu các thông tin trên phiếu chỉ định xét nghiệm và chai cấy máu. Bổ sung phần còn thiếu (nếu có) vào phiếu yêu cầu. Thông tin về chẩn đoán bệnh giúp xử lý bệnh phẩm tốt hơn.

*Các tiêu chí từ chối bệnh phẩm:*

- Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định
- Trong một số trường hợp đặc biệt, thể tích máu không đủ nên thông báo ngay với bác sỹ lâm sàng về mức độ kém chính xác của kết quả.

**b. Các bước thực hiện**

*Quan sát số lượng bệnh phẩm và lưu số:*

Quan sát và ghi nhận số lượng máu lấy được trong chai cấy máu

*Đưa chai cấy máu vào trong máy và ủ ấm:*

- Đưa chai cấy máu vào máy càng sớm càng tốt ngay sau khi nhận được. Chai cấy máu được đưa vào máy theo hướng dẫn sử dụng của từng loại máy.
- Ủ ấm chai cấy máu từ 4 - 7 ngày.

*Lấy chai cấy máu ra khỏi máy:*

Nếu có vi khuẩn mọc, máy sẽ báo dương tính. Nếu không có vi khuẩn mọc, chai cấy máu sẽ được báo âm tính sau thời gian cài đặt thời gian ủ. Các chai cấy máu dương tính và âm tính được đưa ra khỏi máy theo hướng dẫn của từng loại máy.

*Cấy chuyển chai cấy máu dương tính và ủ ấm đĩa thạch:*

- Sát khuẩn đầu nút cao su của chai cấy máu bằng bông cồn 70<sup>0</sup>.
- Dùng bơm tiêm 5 ml đâm kim qua nút cao su rút khoảng 0,5ml máu.
- Nhỏ 1 giọt máu lên lam kính sạch, để khô, cố định rồi nhuộm Gram. Nhận định sơ bộ hình thái, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn.



- Cây chuyển máu sang môi trường BA, CA, SAB và chromagar. Dùng que cấy vô trùng ria đều khắp bề mặt thạch để tạo khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ.

- Ủ ấm thạch BA, CA ở nhiệt độ 35 - 37°C trong tủ ấm CO<sub>2</sub>/ qua đêm.

- Ủ ấm môi trường Chrom agar ở nhiệt độ 35 - 37°C trong tủ ấm thường/ qua đêm.

- Ủ ấm thạch SAB ở nhiệt độ 25 - 30°C trong tủ ấm/ qua đêm.

*Đọc đĩa thạch sau khi ủ ấm:*

- Quan sát bằng mắt thường sự phát triển của vi sinh vật sau 24 tiếng trên tất cả các đĩa thạch.

- Nếu thấy vi sinh vật phát triển:

+ Thông báo ngay cho bác sĩ về kết quả chẩn đoán sơ bộ vi sinh vật dựa vào kết quả nhuộm Gram và hình thái khuẩn lạc (khóm).

+ Tiến hành định danh vi sinh vật.

- Nếu không thấy vi sinh vật phát triển, tiến hành nhuộm Gram lại chai cây máu để định hướng tìm nguyên nhân và khắc phục

*Định danh vi khuẩn và thực hiện kháng sinh đồ:*

- Định danh tất cả các vi sinh vật phát triển trên môi trường. Xác định chi và loài của các tác nhân gây bệnh trong vòng 2 giờ sau khi quan sát thấy khuẩn lạc (khóm):

+ Nhuộm Gram khuẩn lạc (khóm).

+ Quan sát hình thái khuẩn lạc (khóm).

+ Xác định tính chất sinh vật hóa học của vi sinh vật bằng bộ sinh vật hóa học, máy định danh tự động/hoặc định danh vi sinh vật bằng máy định danh khối phổ.

- Thực hiện kháng sinh đồ đối với vi khuẩn/vi nấm gây bệnh.

*Đọc kết quả:*

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn/vi nấm gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn/vi nấm đến mức độ chi và/hoặc loài.

- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn/vi nấm gây bệnh.

*Các vi khuẩn gây nhiễm khuẩn huyết thường gặp:*

- Vi khuẩn Gram âm:

+ *Escherichia coli*

+ *Klebsiella pneumoniae*

+ *Acinetobacter baumannii*

+ *Burkholderia cepacia*

- + *Pseudomonas aeruginosa*
- + *Burkholderia pseudomallei*
- + *Salmonella*
- Vi khuẩn Gram dương:
- + *Staphylococcus aureus*
- + *Streptococcus viridans*
- + *Enterococcus spp.*
- + *Staphylococcus, coagulase negative*
- + *Streptococcus suis*
- + *Streptococcus*, Group D (non-Enterococci)

*Lưu giữ đĩa môi trường và vi khuẩn nuôi cấy dương tính:*

- Lưu giữ các chai cấy máu, đĩa môi trường nuôi cấy dương tính theo qui định của khoa/Phòng/Bộ phận Vi sinh.
- Lưu giữ lâu dài các chủng phân lập được trong tủ lạnh âm sâu.

## **9. Báo cáo kết quả**

### **a. Báo cáo kết quả cấy máu dương tính**

- Báo cáo kết quả nhuộm Gram từ canh thang cấy máu dương tính càng sớm càng tốt, thường là trong vòng 1 tiếng sau khi chai cấy máu dương tính. Sự có mặt của bất kỳ loại vi khuẩn/vi nấm nào đều có ý nghĩa.

- Báo cáo kết quả nuôi cấy sơ bộ chi và loài càng sớm càng tốt trong khi tiếp tục tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

- Báo cáo kết quả định danh vi khuẩn/vi nấm đến mức độ chi và/hoặc loài theo đúng qui định.

+ Cấy máu 1 lần Dương tính với loài vi khuẩn gây bệnh thường gặp sẽ được coi là tác nhân gây nhiễm khuẩn huyết.

+ Cấy máu  $\geq 2$  lần Dương tính với loài vi khuẩn gây bệnh ít gặp như các vi khuẩn *Staphylococci coagulase âm*, *Corynebacteria*, *Bacillus...* có trên da và trong môi trường vẫn được coi là tác nhân gây nhiễm khuẩn huyết.

### **b. Báo cáo kết quả cấy máu âm tính**

- Sau ủ âm 4 ngày nếu không thấy dấu hiệu nghi ngờ có vi khuẩn mọc, trả lời kết quả sơ bộ là “Kết quả sơ bộ cấy máu âm tính sau 4 ngày nuôi cấy”.

- Sau ủ âm 7 ngày máy báo kết quả âm tính, trả lời kết quả cuối cùng là “Kết quả cấy máu âm tính sau 7 ngày nuôi cấy”.

### **c. Báo cáo kết quả cấy máu dương tính giả**

Trong một số trường hợp, máy có thể báo dương tính nhưng do máu bị vỡ hồng cầu. Trong trường hợp này không có vi khuẩn mọc nên được báo cáo như kết quả cấy máu âm tính.

### **d. Báo cáo kết quả cấy máu nhiễm bẩn**

Những trường hợp cấy máu 1 lần dương tính với các vi khuẩn vi hệ trên da, trong môi trường như:

- *Staphylococci coagulase* âm
- *Corynebacterium spp.*
- *Bacillus spp.*
- *Propionibacterium spp.*
- *Streptococcus viridans*
- *Lactobacillus spp.*

## **10. Diễn giải kết quả**

- Báo cáo kết quả cấy máu dương tính nghĩa là bệnh nhân được coi là nhiễm khuẩn huyết.

- Nhiễm khuẩn huyết đa tác nhân có thể xảy ra. Cần kiểm tra lại các bước của quy trình và đối chiếu với lâm sàng.

## **11. Hạn chế**

- Nồng độ vi khuẩn trong máu thấp nên máy không phát hiện được.
- Bệnh nhân đã điều trị kháng sinh từ trước.
- Số lượng máu lấy quá ít, không đủ để vi khuẩn phát triển.
- Môi trường nuôi cấy không phù hợp để phát hiện các vi khuẩn đặc biệt.
- Chất chống đông SPS có thể ức chế vi khuẩn phát triển.
- Một số bệnh có triệu chứng giống như nhiễm khuẩn huyết, có nhiều trường hợp gây sốt chưa rõ nguyên nhân.
  - Vi khuẩn có thể sản xuất CO<sub>2</sub> với nồng độ rất thấp nên máy không phát hiện được.
  - Một số vi khuẩn khó mọc gây nhiễm khuẩn huyết nhưng không phát triển được trong môi trường nuôi cấy thông thường.

## **12. Lưu ý (cảnh báo)**

- Quy trình này chỉ áp dụng để nuôi cấy vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ mọc, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.

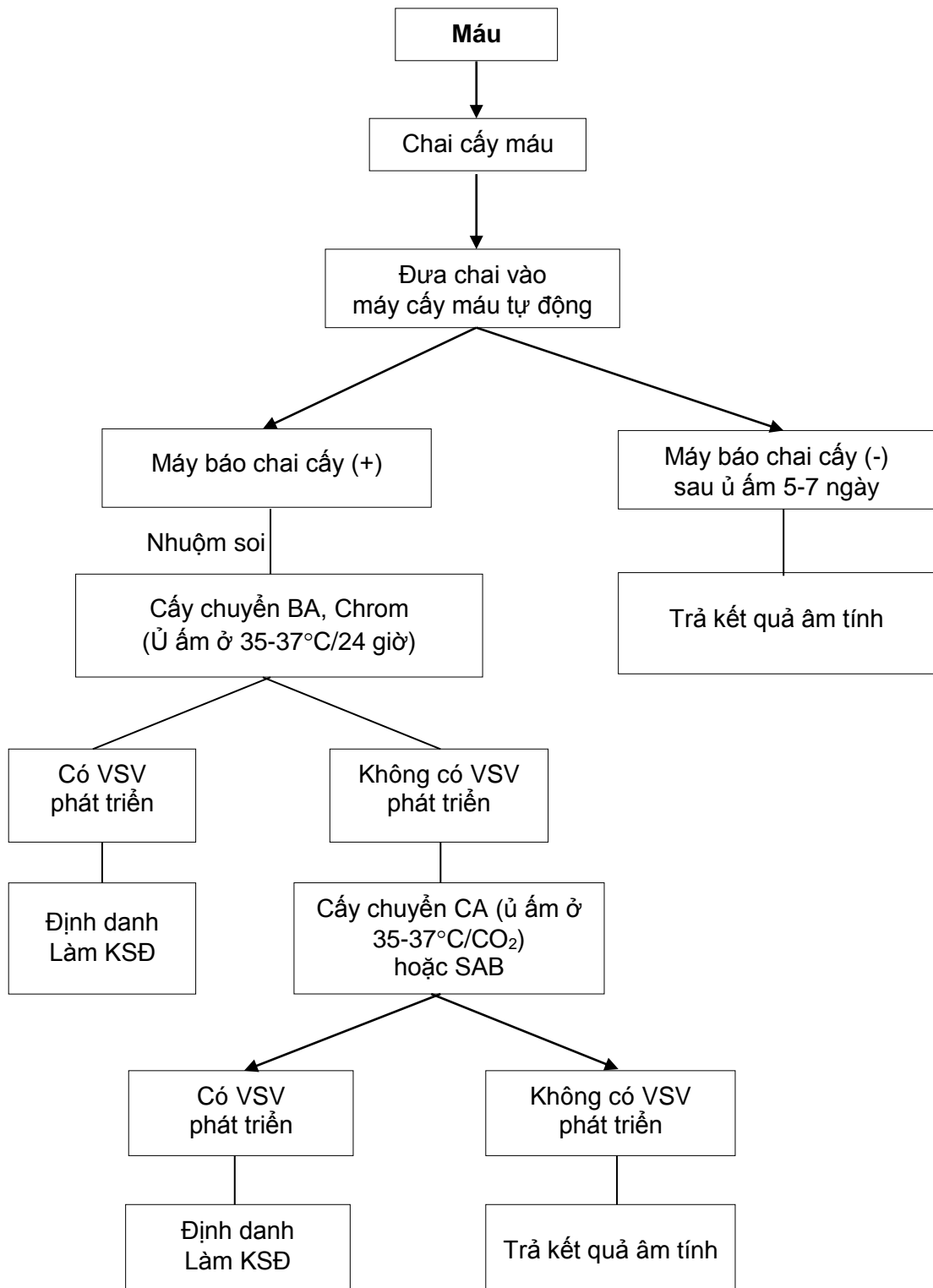
- Nếu bác sỹ lâm sàng có yêu cầu tìm vi khuẩn gây bệnh hiếm gặp, vi nấm gây bệnh phải ghi cụ thể để tránh bỏ sót.

- Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng yêu cầu có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

## **13. Lưu trữ hồ sơ**

Tất cả hồ sơ được lưu trữ theo qui định phù hợp với Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của từng bệnh viện.

### Sơ đồ quy trình cấy máu bằng máy cấy máu tự động



# QUY TRÌNH CÂY DỊCH NÃO TỦY

## 1. Mục đích

Hướng dẫn các bước tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm dịch não tủy bằng kỹ thuật nuôi cấy kính hiển.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này áp dụng cho Khoa/Phòng/Bộ phận xét nghiệm Vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận của chuyên ngành Vi sinh Y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh Y học.

## 4. Nguyên tắc

Kỹ thuật nuôi cấy kính hiển sử dụng các môi trường thạch đĩa giàu chất dinh dưỡng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn gây bệnh. Các vi khuẩn gây bệnh được định danh dựa vào các đặc điểm về hình thái học, nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường 35 - 37°C
- Tủ ấm CO<sub>2</sub>/hoặc các thiết bị tạo CO<sub>2</sub>
- Máy ly tâm tế bào (nếu có)

### b. Dụng cụ

- Pipette vô trùng
- Que cấy
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

### **c. Vật liệu**

*Môi trường nuôi cấy:*

- Thạch máu (BA)
- Thạch Socola (CA)
- Thạch Mac Conkey (MAC)
- Canh thang BHI tăng sinh vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí khó mọc

*Hóa chất:*

- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Bộ thuốc nhuộm Ziehl - Neelsen

*Các chủng quốc tế ATCC:*

Các chủng chuẩn quốc tế ATCC để kiểm tra chất lượng môi trường, hóa chất, sinh phẩm.

### **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.
- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

### **7. An toàn**

- Áp dụng các biện pháp an toàn sinh học cấp II khi xử lý bệnh phẩm và thực hiện xét nghiệm.
- Tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm.
- Sử dụng tủ an toàn sinh học cấp II để tránh nhiễm bẩn và bảo vệ cho nhân viên.

### **8. Nội dung thực hiện**

#### **a. Chuẩn bị**

*Lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm:*

Bệnh phẩm được lấy, vận chuyển và bảo quản theo quy định của Khoa/ Phòng/ Bộ phận xét nghiệm vi sinh

- Thời điểm và kỹ thuật lấy: Do các bác sỹ lâm sàng, điều dưỡng chỉ định và thực hiện.
- Dụng cụ chứa bệnh phẩm: Ống có nắp chặt (không có chất chống đông) hoặc lọ vô trùng có nắp xoáy. Trên dụng cụ chứa phải được dán nhãn có đầy đủ thông tin của đúng bệnh nhân, ngày và thời điểm lấy bệnh phẩm.

- Thê tích: Lấy khoảng 1-5 ml

- Vận chuyển: Gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt vì các tác nhân gây bệnh ở dịch não tủy rất dễ chết.

- Bảo quản: Nếu chưa gửi ngay, có thể bảo quản ở nhiệt độ 35 - 37°C nhưng không quá 4 tiếng. Tuyệt đối không được bảo quản trong tủ lạnh.

*Tiếp nhận bệnh phẩm:*

- Quan sát tình trạng của dụng cụ chứa bệnh phẩm.

- Quan sát điều kiện bảo quản và thời gian vận chuyển phù hợp.

- Đối chiếu các thông tin trên phiếu chỉ định xét nghiệm và ống chứa bệnh phẩm. Bổ sung phần còn thiếu (nếu có) vào phiếu yêu cầu. Thông tin về chẩn đoán bệnh giúp xử lý bệnh phẩm tốt hơn.

- Ghi nhận ngày nhận mẫu, thời điểm nhận mẫu và người nhận.

*Các tiêu chí từ chối bệnh phẩm:*

- Bệnh phẩm lầy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định.

- Trong một số trường hợp đặc biệt, thê tích bệnh phẩm dịch não tủy không đủ hoặc dụng cụ chứa bệnh phẩm bị rò rỉ có khả năng bị nhiễm bẩn vẫn có thể nuôi cấy nhưng báo ngay với bác sỹ lâm sàng về mức độ kém chính xác của kết quả.

## **b. Các bước thực hiện**

Xử lý bệnh phẩm dịch não tủy càng sớm càng tốt, ngay sau khi nhận bệnh phẩm.

*Quan sát bệnh phẩm và lưu số:*

- Số lượng dịch não tủy

- Tính chất: Trong hoặc đục

- Màu sắc: Không màu hoặc vàng hoặc lẫn máu. Dịch não tủy bình thường không màu, trong suốt và vô trùng.

*Nhuộm soi:*

- Nhuộm Gram dịch não tủy: phát hiện vi khuẩn, nấm gây bệnh.

+ Dịch não tủy để lắng, không ly tâm (ASM - Clinical microbiology handbook procedure - 2010)/ Hoặc dịch não tủy ly tâm 10000g trong 5-10 phút (WHO - Basic laboratory procedures in clinical bacteriology - 2003).

+ Chuẩn bị lam nhuộm: nhỏ 1 hoặc 2 giọt dịch não tủy lên một lam kính tráng cồn để tạo thành một giọt lớn, không dàn tiêu bản.

+ Để lam kính khô tự nhiên trong tủ an toàn sinh học/ Hoặc đặt trên máy sấy lam/ Hoặc phủ lên trên bằng một lam kính âm hơn.

+ Cố định tiêu bản bằng nhiệt hoặc methanol.



+ Tiến hành nhuộm Gram theo quy trình.

- Nhuộm Ziehl - Neelsen dịch não tủy: phát hiện trực khuẩn kháng acid (AFB)

+ Chuẩn bị tiêu bản và tiến hành nhuộm theo quy trình

*Nuôi cấy:*

- Sử dụng một pipet vô trùng, hút dịch từ đáy ống bệnh phẩm.

- Nhỏ 2 hoặc 3 giọt dịch não tủy vào môi trường BA, CA và MAC và cấy phân vùng.

- Cấy thêm 1 ml vào canh thang BHI tăng sinh vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí khó mọc nếu số lượng dịch não tủy nhiều hơn 1 ml.

+ Bệnh phẩm của khoa cấp cứu thường là viêm màng não mắc phải từ cộng đồng.

+ Bệnh phẩm của khoa thần kinh có thể do vi khuẩn kỵ khí nên cần cấy thêm canh thang.

+ Nếu dịch não tủy được thu thập với số lượng lớn, thường từ ống dẫn lưu hoặc túi chứa dịch.

- Nếu bệnh phẩm dịch não tủy chỉ là 1 - 5 giọt, tiến hành như sau:

+ Sử dụng một pipet Pasteur vô trùng, nhỏ khoảng 0,5 ml canh thang BHI tăng sinh vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí khó mọc vào ống bệnh phẩm. Đậy nắp ống, và lắc ống để trộn bệnh phẩm.

+ Sử dụng canh thang BHI đã trộn bệnh phẩm để cấy lên các môi trường và nhuộm Gram.

+ Thông báo với bác sỹ lâm sàng về số lượng bệnh phẩm dịch não tủy đã nhận được.

*Lưu giữ bệnh phẩm dịch não tủy:*

Có thể lưu giữ bệnh phẩm dịch não tủy ở 4°C và/hoặc ở - 20°C trong những trường hợp cần thiết, ví dụ cho các xét nghiệm sử dụng kỹ thuật PCR.

*Ủ ấm:*

- Ủ ấm thạch BA và CA ở 35-37°C trong khí trường 5% CO<sub>2</sub>/48-72 giờ.

- Ủ ấm thạch MAC ở 35-37°C trong khí trường thường/48-72 giờ.

- Ủ ấm canh thang BHI ở 35 - 37°C trong khí trường kỵ khí.

*Đọc đĩa thạch sau khi ủ ấm:*

- Quan sát bằng mắt thường sự phát triển của vi sinh vật sau 24 tiếng trên tất cả các đĩa thạch và canh thang BHI.

- Nếu thấy vi sinh vật phát triển:

+ Thông báo ngay cho bác sỹ về kết quả chẩn đoán sơ bộ vi sinh vật dựa vào hình thái và khuẩn lạc (khóm).

+ Tiến hành định danh vi sinh vật.

- Nếu không thấy vi sinh vật phát triển, tiếp tục ủ ấm thêm.

+ Quan sát đĩa môi trường hàng ngày trong 4 ngày.

+ Nếu kết quả nhuộm Gram từ bệnh phẩm có vi sinh vật nhưng không thấy mọc khuẩn lạc (khóm) hoặc chỉ định yêu cầu cấy nấm, ủ ấm tất cả các đĩa thạch ít nhất 1 tuần.

+ Kiểm tra canh thang BHI hàng ngày trong 4 ngày và giữ đến 7 ngày trước khi bỏ.

*Định danh vi khuẩn và thực hiện kháng sinh đồ:*

- Định danh tất cả các vi sinh vật phát triển trên môi trường. Xác định chi và loài của các tác nhân gây bệnh ở dịch não tủy trong vòng 2 giờ sau khi quan sát thấy khuẩn lạc (khóm):

+ Nhuộm Gram khuẩn lạc (khóm).

+ Quan sát hình thái khuẩn lạc (khóm).

+ Xác định tính chất sinh vật hóa học của vi sinh vật bằng bộ sinh vật hóa học, máy định danh tự động/ Hoặc định danh vi sinh vật bằng máy định danh khối phổ.

- Thực hiện kháng sinh đồ đối với vi khuẩn/ vi nấm gây bệnh.

*Đọc kết quả:*

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn/ vi nấm gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn vi nấm đến mức độ chi và/hoặc loài.

- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn/ vi nấm gây bệnh.

*Các vi khuẩn gây viêm màng não cấp thường gặp:*

<b>Tuổi hoặc bệnh lý</b>	<b>Vi khuẩn</b>
Sơ sinh	<i>E. coli</i> <i>S. agalactiae</i> <i>Listeria monocytogenes</i>
< 2 tháng tuổi	<i>S. agalactiae</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i>
< 10 tuổi	<i>H. influenzae</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>N. meningitidis</i>
Thiếu niên	<i>N. meningitidis</i>
Người trưởng thành	<i>S. pneumoniae</i>

Tuổi hoặc bệnh lý	Vi khuẩn
	<i>N. meningitidis</i>
Người cao tuổi	<i>S. pneumoniae</i> Các trực khuẩn Gram âm <i>L. monocytogenes</i>
Nhiễm khuẩn hệ thống thần kinh/ Hoặc viêm não thất	Staphylococci coagulase âm <i>S. aureu</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Propionibacterium acnes</i> Các trực khuẩn Gram âm hiếu khí Các vi khuẩn kỵ khí

*Lưu giữ đĩa môi trường và vi khuẩn nuôi cấy dương tính:*

- Lưu giữ các đĩa môi trường nuôi cấy dương tính theo qui định của khoa/ Phòng/ Bộ phận Vi sinh.

- Lưu giữ lâu dài các chủng phân lập được trong tủ lạnh âm sâu.

## 9. Báo cáo kết quả

- Báo cáo kết quả nhuộm Gram càng sớm càng tốt, thường là trong vòng 1 tiếng sau khi nhận bệnh phẩm. Sự có mặt của bất kỳ loại vi khuẩn/ vi nấm nào đều có ý nghĩa. Tuy nhiên, trong trường hợp số lượng vi sinh vật rất ít, chỉ quan sát được trên 1 hoặc 2 vi trường, nên làm thêm một tiêu bản thứ 2 để khẳng định.

- Báo cáo kết quả nuôi cấy sơ bộ chi và loài càng sớm càng tốt trong khi tiếp tục tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

- Báo cáo kết quả định danh vi khuẩn/ vi nấm đến mức độ chi và/hoặc loài theo đúng qui định.

## 10. Diễn giải kết quả

- Các vi sinh vật nuôi cấy dương tính được coi là tác nhân gây bệnh.

- Không thấy bạch cầu đa nhân trung tính trong dịch não tủy không loại trừ nhiễm khuẩn, đặc biệt là nhiễm *Listeria*.

- Nguyên nhân phổ biến nhất của viêm màng não do vi khuẩn mắc phải ở cộng đồng là *S. pneumoniae*.

- Phân lập được *N. meningitidis* từ dịch não tủy phải báo cáo ngay để có biện pháp phòng ngừa vi khuẩn này gây dịch và sử dụng kháng sinh dự phòng.

- Phân lập được Enterococci trong dịch não tủy thường có căn nguyên liên quan, ví dụ có thể nhiễm giun lợn.

### **11. Hạn chế**

- Dương tính giả có thể do bệnh phẩm bị nhiễm bản hoặc nhiễm vi khuẩn cư trú trên da.

- Âm tính giả có thể do vi khuẩn có trong bệnh phẩm với số lượng ít, bệnh nhân đã điều trị kháng sinh từ trước hoặc vi sinh vật khó nuôi cấy.

### **12. Lưu ý (cảnh báo)**

- Quy trình này chỉ áp dụng để nuôi cấy vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ mọc, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả Âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.

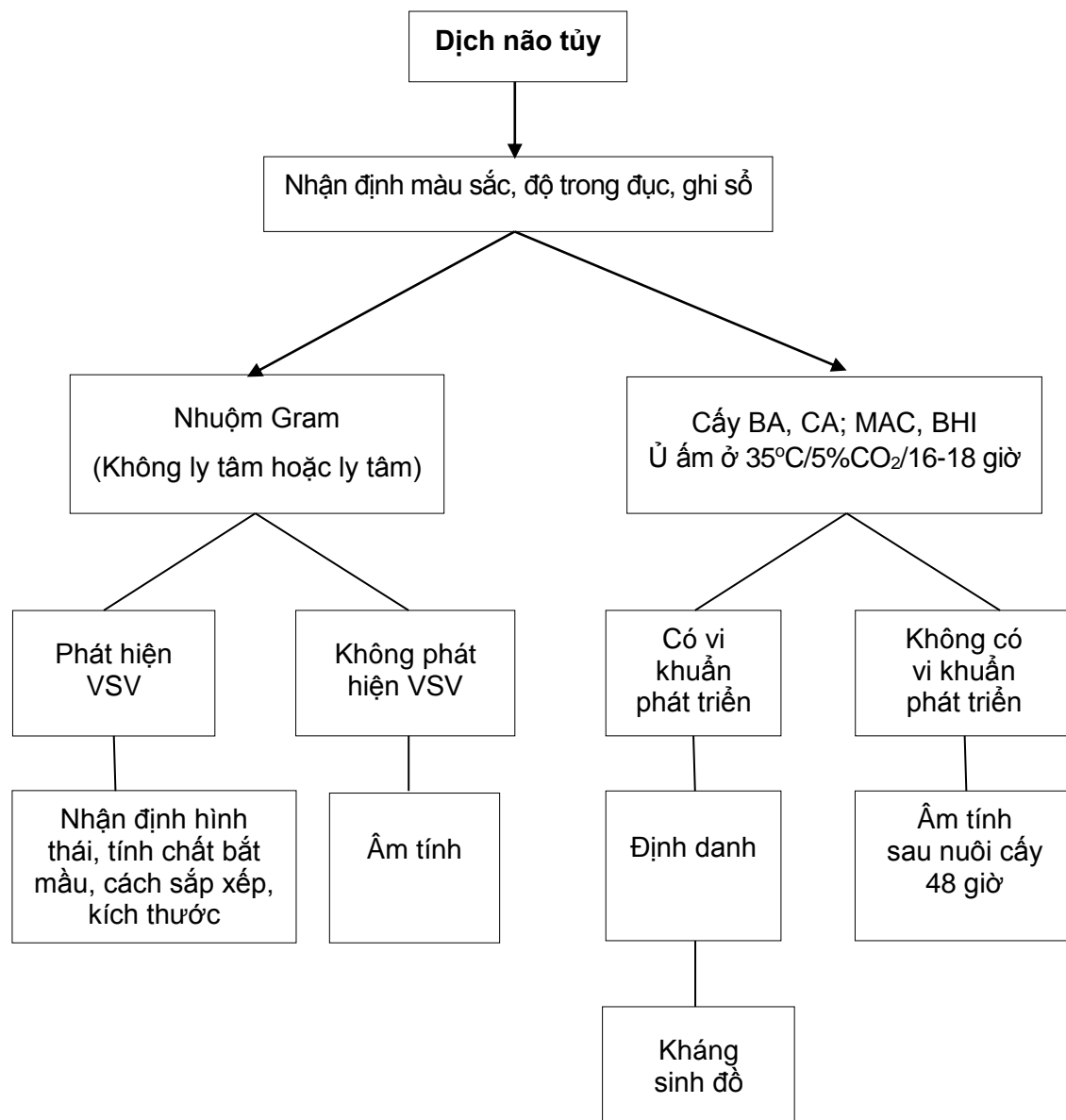
- Nếu bác sỹ lâm sàng có yêu cầu tìm vi khuẩn gây bệnh hiếm gặp, vi nấm gây bệnh phải ghi cụ thể để tránh bỏ sót.

- Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng yêu cầu có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

### **13. Lưu trữ hồ sơ**

Tất cả hồ sơ được lưu trữ theo qui định phù hợp với Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của từng bệnh viện.

## Sơ đồ quy trình cấy dịch não tủy



# QUY TRÌNH CÂY CÁC BỆNH PHẨM DỊCH

## 1. Mục đích

Hướng dẫn cách thực hiện quy trình kỹ thuật nuôi cấy, định danh một số vi sinh vật từ các bệnh phẩm dịch.

## 2. Phạm vi áp dụng

- Quy trình này áp dụng cho Khoa/Phòng/Bộ phận xét nghiệm Vi sinh khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp từ các bệnh phẩm dịch được thu thập từ bệnh nhân có triệu chứng nhiễm trùng hay từ bệnh nhân có các yếu tố nguy cơ nhiễm trùng.

- Bệnh phẩm các chất dịch bao gồm: Dịch màng phổi, dịch màng tim, dịch trung thất, dịch ổ bụng, dịch mật, dịch thẩm phân phúc mạc, dịch các vết thương...

## 3. Trách nhiệm

- Khoa lâm sàng thu thập mẫu dịch đúng theo quy trình hướng dẫn và vận chuyển mẫu để có được bệnh phẩm tốt nhất cho nuôi cấy. Thông tin loại mẫu thu thập cần phải thể hiện trong phiếu xét nghiệm đi kèm để phòng xét nghiệm có căn cứ biện luận kết quả nuôi cấy.

- Phòng xét nghiệm có nhiệm vụ nhận, kiểm tra và tiến hành xét nghiệm mẫu theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Người thực hiện: Đã được đào tạo có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh và được phân công.

- Người nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học được phân công.

## 4. Nguyên tắc

Sử dụng môi trường đĩa thạch giàu chất dinh dưỡng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn. Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm hình thái học nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO<sub>2</sub>/hoặc thiết bị tạo CO<sub>2</sub>
- Máy ly tâm tế bào (nếu có)

## **b. Dụng cụ**

- Pipette vô trùng
- Que cấy 1  $\mu$ L
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

## **c. Vật liệu**

*Môi trường nuôi cấy:*

- BA (Blood Agar): Thạch máu
- MC (MacConkey)
- CA (Chocolate Agar)

*Hóa chất:*

- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Bộ thuốc nhuộm Ziehl - Neelsen
- Bộ thuốc nhuộm xanh methylen

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

- Các chủng ATCC.

## **7. An toàn**

- An toàn sinh học cấp II.
- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý bệnh phẩm và thực hiện xét nghiệm.
- Tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm**

- Bệnh phẩm vô trùng:

Dịch màng bụng, dịch tủy xương.. bệnh phẩm cho vào chai cấy máu.

- Bệnh phẩm tạp nhiễm:

- + Các dịch từ vết thương hở... cho vào ống lấy bệnh phẩm vô trùng.
- + Bệnh phẩm nghi vi khuẩn kỵ khí cho vào ống Thyoglycolate (lấy từ khoa xét nghiệm vi sinh trước lúc chuẩn bị cấy).
- + Bệnh phẩm được lấy, vận chuyển và bảo quản theo quy định của phòng xét nghiệm vi sinh.
- + Thời điểm và kỹ thuật lấy: Do bác sĩ lâm sàng, điều dưỡng thực hiện.
- + Dụng cụ chứa: Ống hoặc lọ vô trùng có nắp vặn, dụng cụ chứa các chất dịch phải được dán nhãn đúng với tên của bệnh nhân, tốt nhất là dùng barcode.
- + Thẻ tích: Lấy khoảng 2-5 ml.
- + Vận chuyển: Gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt < 1 giờ.
- + Bảo quản: Nếu chưa gửi ngay, cho bệnh phẩm vào môi trường vận chuyển Stuart hay Amies.
- + Có thể bảo quản ở nhiệt độ 35 - 37°C nhưng không quá 6 giờ.

### **b. Tiếp nhận bệnh phẩm**

- Quan sát tình trạng dụng cụ chứa bệnh phẩm.
- Quan sát điều kiện bảo quản và thời gian vận chuyển phù hợp.
- Nhãn ống/lọ đựng bệnh phẩm đúng với tên, năm sinh của bệnh nhân hoặc mã số duy nhất.
- Phiếu chỉ định xét nghiệm phải ghi rõ thông tin tên, tuổi bệnh nhân, khoa điều trị, thông tin chẩn đoán, vị trí lấy, thời điểm lấy, giao và nhận mẫu bệnh phẩm, chữ ký của bác sĩ chỉ định.
- Đối chiếu các thông tin về bệnh phẩm trên phiếu chỉ định xét nghiệm và ống/lọ chứa bệnh phẩm.

### **c. Tiêu chuẩn từ chối mẫu**

- Bệnh phẩm không có nhãn, phiếu chỉ định xét nghiệm không đầy đủ, đối chiếu không phù hợp giữa nhãn và phiếu chỉ định.
- Thiếu số lượng thể tích
- Có dấu hiệu đổ vỡ, rò rỉ
- Bệnh phẩm đưa đến phòng xét nghiệm muộn, không có chất bảo quản.

### **d. Các bước thực hiện**

- Phòng vi sinh tiếp nhận xử lý bệnh phẩm càng sớm càng tốt ngay sau khi nhận được (trong vòng 30 phút sau khi nhận bệnh phẩm).
- Các thao tác thực hiện trong tủ an toàn sinh học cấp II.



*Quan sát mẫu và lưu thông tin:*

- Số lượng
- Tính chất
- Màu sắc

*Thực hiện nhuộm Gram:*

Thực hiện nhuộm Gram theo quy trình, trả kết quả sau 1 giờ nhận bệnh phẩm.

*Nuôi cấy phân lập theo quy trình kỹ thuật:*

- Cấy vào môi trường: MC, BA, CA
- Ủ ấm đĩa thạch ở 35 - 37°C và 35 - 37°C có 5% CO<sub>2</sub>.

*Lưu giữ bệnh phẩm:*

Lưu giữ bệnh phẩm ở 4°C và/hoặc ở -20°C trong 1 tuần cho các yêu cầu tiếp theo.

*Đọc các đĩa thạch sau ủ ấm:*

Sau 24 giờ quan sát bằng mắt thường sự phát triển của các khóm vi khuẩn trên các đĩa thạch và ống môi trường (Thyoglycolate) nếu có ủ ấm.

- Nếu không thấy khóm khuẩn mọc, tiếp tục ủ ấm.
- Quan sát đĩa thạch hằng ngày trong 3 ngày.
- Nếu nhuộm Gram có vi khuẩn nhưng không thấy vi khuẩn mọc yêu cầu cấy nấm, và giữ tất cả các đĩa thạch ít nhất 1 tuần.
- Kiểm tra môi trường hằng ngày trong 4 ngày và giữ đến 7 ngày trước khi bỏ.

#### **f. Định danh và thực hiện kháng sinh đồ**

- Định danh vi khuẩn:

Chọn khuẩn lạc (khóm) và thực hiện định danh bằng các bộ kit định danh thủ công (ví dụ như API), hoặc định danh bằng card trên máy tự động VITEK II, Phoenix (T124).. MALDI-TOF MS.

- Kháng sinh đồ: Thực hiện kỹ thuật khuếch tán đĩa giấy hoặc bằng card trên máy tự động (VITEK, Phoenix...)

*Trả kết quả theo quy trình trả kết quả:*

Lưu đĩa nuôi cấy 5 - 7 ngày và lưu chủng ở - 80°C.

*Các vi khuẩn thường gặp:*

- Dịch khớp viêm tủy xương: *S. aureus*, *Enterobacter* và *Streptococcus* nhóm nhóm A và B, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella*..

- Dịch màng phổi: *S. aureus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus* vi khuẩn kỵ khí.

- *Bacteroides* và *Peptostreptococcus*, *Mycobacteria tuberculosis*, nấm.

- DRPQ: *S. aureus*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma*..

- Dịch ổ bụng, dịch mật: *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp.

- *Pseudomonas* spp., Enterococci, *Anaerobe*, nấm.

*Hạn chế:*

- Mọc nhiều loại vi khuẩn: Do nhiễm bản hoặc ngoại nhiễm vi khuẩn cư trú ở da.

- Âm tính: Vi khuẩn có trong bệnh phẩm với số lượng ít, bệnh nhân đã điều trị kháng sinh từ trước hoặc vi sinh vật khó nuôi cấy.

## 9. Báo cáo kết quả

- Trả kết quả nhuộm Gram càng sớm càng tốt, thường là trong vòng 1 tiếng sau khi nhận bệnh phẩm. Sự có mặt của bất kỳ loại vi khuẩn nào đều có ý nghĩa chẩn đoán sơ bộ.

- Trả kết quả nuôi cấy sau khi định danh và thực hiện kháng sinh đồ.

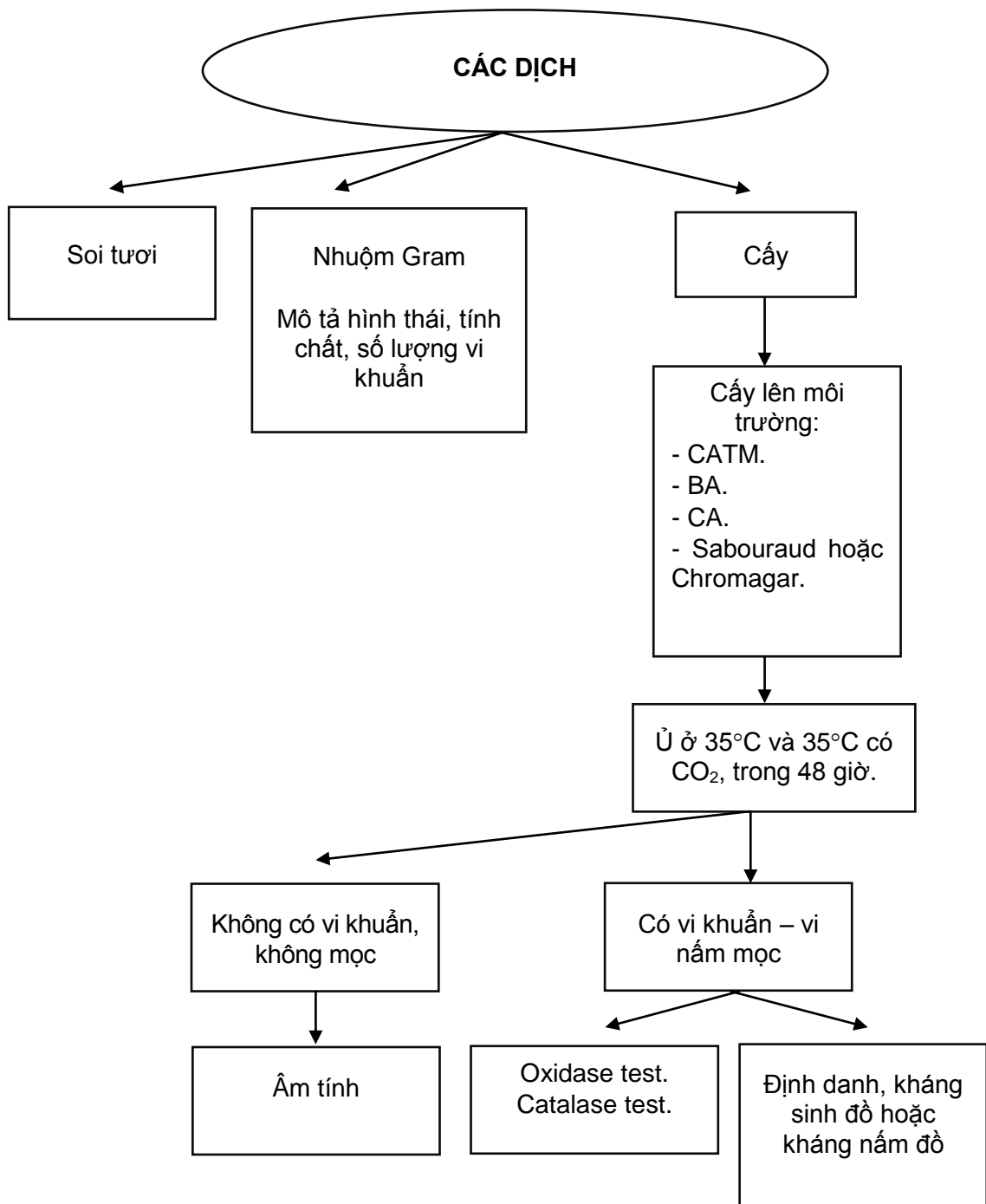
## 10. Lưu ý

Kết quả Âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.

- Nếu bác sĩ lâm sàng có yêu cầu tìm vi khuẩn gây bệnh hiếm gặp, vi khuẩn kỵ khí, vi nấm gây bệnh phải ghi cụ thể yêu cầu xét nghiệm để tránh bỏ sót.

- Lấy bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng quy định có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

**11. Lưu trữ hồ sơ:** Theo quy định.



**Sơ đồ kỹ thuật thực hiện nuôi cấy bệnh phẩm dịch**

# QUY TRÌNH CÂY CATHETER (ỐNG THÔNG TĨNH MẠCH TRUNG TÂM)

## 1. Mục đích

Hướng dẫn cách thực hiện quy trình kỹ thuật nuôi cấy, định danh một số vi sinh vật gây nhiễm trùng từ dụng cụ Catheter đặt cho bệnh nhân.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này áp dụng cho khoa/phòng xét nghiệm Vi sinh trong giờ hành chính và giờ trực khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp từ dịch catheter.

## 3. Trách nhiệm

- Khoa lâm sàng thu thập mẫu catheter và dịch từ catheter đúng theo hướng dẫn và vận chuyển mẫu để có được bệnh phẩm tốt nhất cho nuôi cấy. Thông tin loại mẫu thu thập cần phải thể hiện trong phiếu xét nghiệm đi kèm để phòng xét nghiệm có căn cứ biện luận kết quả nuôi cấy.

- Phòng xét nghiệm có nhiệm vụ nhận, kiểm tra và tiến hành xét nghiệm mẫu theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Sử dụng môi trường đĩa thạch giàu chất dinh dưỡng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn. Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất hình thái học chuyên hóa, và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO<sub>2</sub>/hoặc thiết bị tạo CO<sub>2</sub>
- Máy ly tâm tế bào (nếu có)

## **b. Dụng cụ**

- Pipette vô trùng
- Que cấy 1  $\mu$ L
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

## **c. Vật liệu**

*Môi trường nuôi cấy:*

- Thạch máu (BA)
- Thạch MacConkey (MC)
- Thạch EMB (Eosin Methylene Blue)

*Hóa chất:*

Bộ thuốc nhuộm Gram

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại hoá chất, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.
- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.
- Các chủng ATCC.

## **7. An toàn**

- An toàn sinh học cấp II.
- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý bệnh phẩm và thực hiện xét nghiệm.
- Tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Chuẩn bị**

- Cấy 2 chai máu cùng thời điểm: 1 chai cấy từ catheter, 1 chai cấy ở vị trí khác.
- Sát khuẩn da bằng cồn 70<sup>0</sup> trước khi loại bỏ catheter.
- Tuân thủ kỹ thuật vô trùng, giữ đoạn cuối tiếp xúc của catheter và cẩn thận tháo catheter từ bệnh nhân với một dụng cụ vô trùng, cẩn thận tránh tiếp xúc với da. Giữ đầu cuối của catheter cho vào túi vô trùng, dùng kéo vô trùng cắt khoảng 5-8 cm cho tiếp vào túi hoặc tube, lọ vô trùng.

- Tránh làm khô bằng cách đóng kín nắp và gửi đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt.

- Catheter không để trong nước muối và môi trường vận chuyển.

- Thực hiện tiêu bản nhuộm Gram từ dịch catheter.

- Gửi catheter nuôi cấy khi có dấu hiệu nhiễm trùng và nên thực hiện cấy máu.

- Cấy mũ khi có nhiễm trùng tại chỗ đặt catheter.

*Lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm:*

- Catheter được lấy, vận chuyển và bảo quản theo quy định.

- Thời điểm và kỹ thuật lấy: Do bác sỹ lâm sàng, điều dưỡng thực hiện.

- Dụng cụ chứa: Túi hoặc lọ vô trùng có nắp vặn, dụng cụ chứa phải được dán nhãn đúng với tên của bệnh nhân, tốt nhất dùng barcode.

- Vận chuyển: Gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt trong vòng 1 giờ

*Tiếp nhận bệnh phẩm:*

- Quan sát tình trạng dụng cụ chứa bệnh phẩm

- Nhãn ống/lọ đựng bệnh phẩm đúng với tên, năm sinh của bệnh nhân hoặc mã số duy nhất.

- Phiếu chỉ định xét nghiệm phải ghi rõ thông tin về tên, tuổi bệnh nhân, khoa điều trị, thông tin chẩn đoán, vị trí lấy, thời điểm lấy, chữ ký của bác sỹ chỉ định, ký giao và nhận mẫu bệnh phẩm.

- Đối chiếu các thông tin về bệnh phẩm trên phiếu chỉ định xét nghiệm và ống/lọ chứa bệnh phẩm.

*Tiêu chuẩn từ chối mẫu:*

Bệnh phẩm không có nhãn, phiếu chỉ định xét nghiệm không đầy đủ, đối chiếu không phù hợp giữa nhãn và phiếu chỉ định.

## **b. Các bước thực hiện**

- Phòng vi sinh tiếp nhận xử lý bệnh phẩm càng sớm càng tốt, ngay sau khi nhận được (trong vòng 30 phút sau khi nhận bệnh phẩm).

- Các thao tác thực hiện trong tủ an toàn sinh học cấp II.

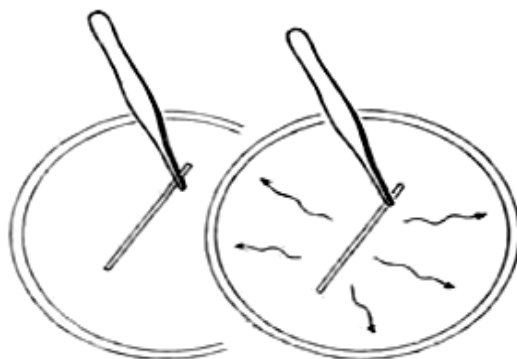
*Nuôi cấy phân lập theo quy trình kỹ thuật:*

Phương pháp bán định lượng

- Sử dụng một chiếc kẹp vô trùng, loại bỏ đầu catheter từ ống vận chuyển.

- Sử dụng kẹp vô trùng phết nhẹ nhàng đầu catheter qua lại trên toàn bộ bề mặt của hộp thạch BA, MC hoặc EMB.

- Nếu catheter quá dài, cắt bằng kéo vô trùng cho vào hộp thạch thứ 2.



**Hình:** Cấy catheter vào các đĩa thạch

- Ủ ở 35°C và 35°C có CO<sub>2</sub>.

- Nên được ủ cho đến 4 ngày, chủ yếu là để tìm nấm men, trong đó có những khuẩn khuẩn sẽ phát triển mọc trong 3 ngày.

### **c. Đọc các đĩa thạch sau ủ ấm 24, 48, 72, 96 giờ**

- Đếm từng loại khuẩn lạc (khóm) được phân lập, so sánh tốc độ tăng trưởng trên mỗi môi trường. Nhận dạng mức độ những việc sau đây:

+ Đếm số lượng khuẩn lạc (khóm): 15 khuẩn lạc (khóm) (15 CFU) của các loài vi khuẩn bao gồm trực khuẩn Gram dương

+ Chỉ định danh tác nhân gây bệnh quan trọng (ví dụ: *C. albicans*, *Streptococcus* nhóm A, và trực khuẩn gram âm).

- Lưu đĩa thạch 1 tuần để so sánh với kết quả cấy máu dương tính.

### **d. Định danh vi khuẩn**

Chọn khuẩn lạc (khóm) và thực hiện định danh bằng các bộ kit định danh thủ công (ví dụ như API), hoặc định danh bằng card trên máy tự động VITEK II, Phoenix.. MALDI-TOF MS.

## **9. Báo cáo kết quả**

- Trường hợp vi khuẩn với số lượng < 15 CFU (15 khuẩn lạc (khóm))
- Báo cáo kết quả nuôi cấy Âm tính "Không có sự tăng trưởng của vi khuẩn tại ngày ủ cuối cùng, ví dụ: "Không có tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn ở mức 4 ngày."
- Trường hợp vi khuẩn với số lượng ≥ 15 CFU (15 khuẩn lạc (khóm))
- + Trả kết quả nhập số CFU cho mỗi vi khuẩn phân lập được, Ví dụ: 18 CFU *E. coli*
- + Nếu có hiện diện của *Coagulase-negative staphylococcus* (CoNS) hình thái khác nhau trả kết quả số CFU CoNS (hỗn hợp)

+ Nếu có hiện diện của nhóm vi sinh vật hỗn hợp thường trú trên da (ví dụ, *coagulase Negative Staphylococcus*, *diphtheroids*, *Non - Candida albicans*, *Acinetobacter*, hoặc nhóm *streptococci viridans*) trả kết quả số CFU của hệ vi khuẩn hỗn hợp thường trú trên da.

- Trường hợp khuẩn lạc (khóm) quá nhiều không thể đếm, trả kết quả là: 100 CFU.

- Nếu phân lập được trực khuẩn gram âm hoặc *S. aureus* mà lâm sàng không có gửi xét nghiệm cấy máu, đề nghị lâm sàng "Gửi cấy máu để chẩn đoán nhiễm trùng liên quan catheter."

- Giải thích kết quả: Sự hiện diện của 15 CFU cho thấy catheter có tiềm năng của nhiễm khuẩn huyết.

- Trả kết quả: Trả kết quả nuôi cấy sau khi định danh và thực hiện kháng sinh đồ.

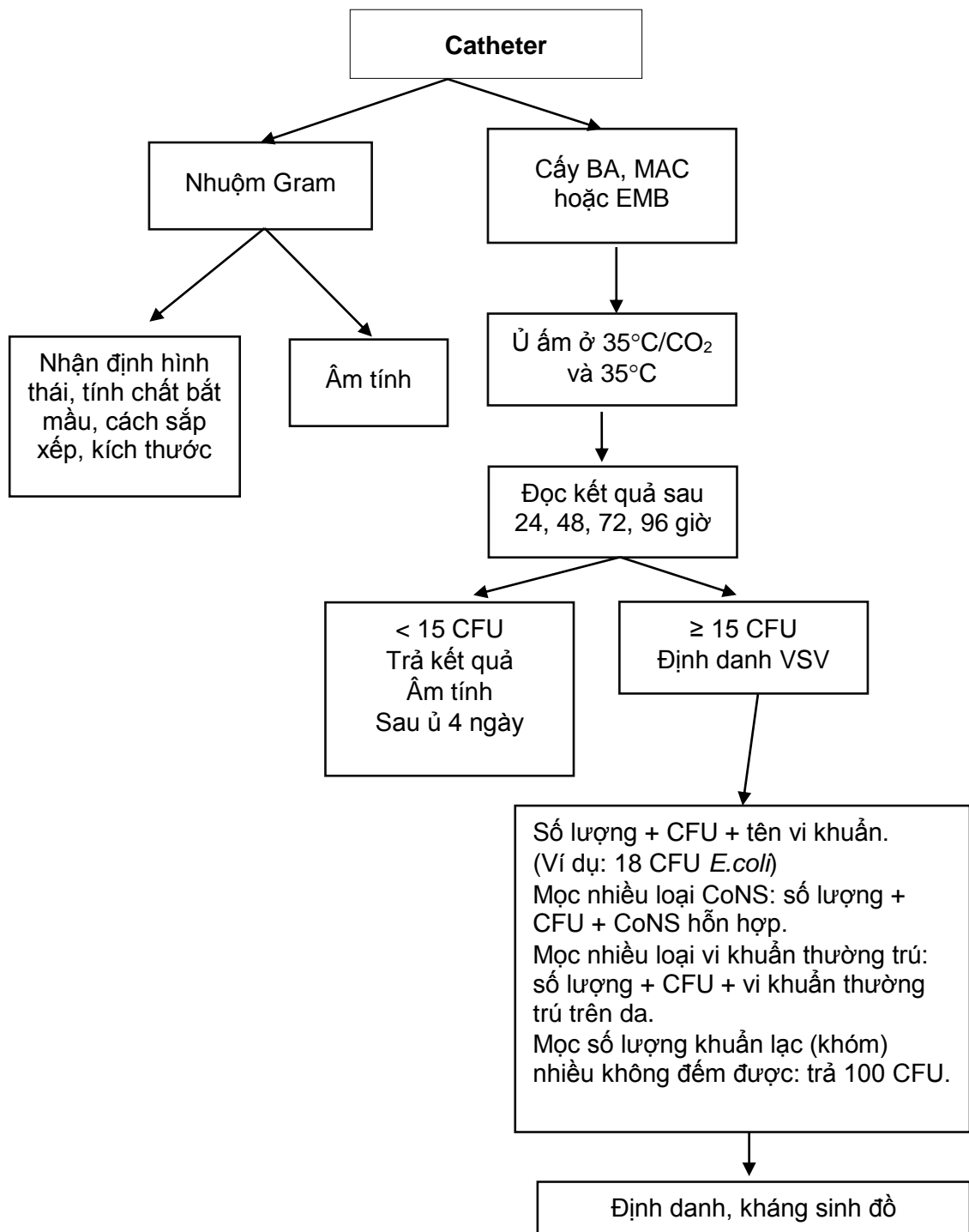
- Lưu chủng ở - 80°C

## 10. Lưu ý

Cây bán định lượng đầu catheter được ước tính có độ nhạy 85% trong chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết liên quan catheter, nhưng độ đặc hiệu để chẩn đoán nhiễm trùng huyết liên quan đến catheter thì thấp. Kết hợp cấy máu lấy từ các vị trí ngoại biên là hữu ích trong việc khẳng định chẩn đoán nhiễm trùng huyết có liên quan catheter.

**11. Lưu trữ hồ sơ:** Theo quy định.





**Sơ đồ kỹ thuật thực hiện nuôi cấy vi khuẩn từ catheter  
(tĩnh mạch trung tâm)**

# QUY TRÌNH CÂY BỆNH PHẪM MŨ

## 1. Mục đích

Hướng dẫn cách thực hiện kỹ thuật nuôi cấy phân lập vi khuẩn gây bệnh thường gặp từ bệnh phẩm mũ.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này áp dụng cho Khoa/Phòng/Bộ phận xét nghiệm Vi sinh, khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm mũ.

## 3. Trách nhiệm

- Khoa lâm sàng thu thập mẫu mũ đúng theo hướng dẫn và vận chuyển mẫu để có được bệnh phẩm tốt nhất cho nuôi cấy. Thông tin loại mẫu thu thập cần phải thể hiện trong phiếu xét nghiệm đi kèm để phòng xét nghiệm có căn cứ biện luận kết quả nuôi cấy.

- Phòng xét nghiệm có nhiệm vụ nhận, kiểm tra và tiến hành xét nghiệm mẫu theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Nhân viên làm xét nghiệm phải được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Người nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

- Sử dụng các môi trường chuyên biệt, chọn lọc để nuôi cấy, tăng sinh, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mũ.

- Kết quả cấy phải luôn được lý giải phối hợp với các đặc điểm trên lâm sàng, đặc biệt là các mẫu que cấy bề mặt.

## 5. Thiết bị và vật tư

### a. Thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II.
- Tủ ấm CO<sub>2</sub>/hoặc thiết bị tạo CO<sub>2</sub>.
- Tủ ấm thường
- Kính hiển vi quang học.

### b. Dụng cụ

- Que cấy

- Pipette vô trùng
- Lam kính
- Đèn cồn
- Dầu soi

### **c. Vật liệu**

- Hộp thạch: MC, BA, CA, thạch Sabouraud.
- Môi trường Thioglycolate.
- Bộ thuốc nhuộm Gram.
- Bộ thuốc nhuộm Ziehl-Neelsen.

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng. Kiểm tra chất lượng môi trường: mỗi lô môi trường sản xuất ra phải được kiểm tra về độ vô khuẩn, khả năng mọc của vi sinh vật và khả năng tạo ra các phản ứng sinh hóa thích hợp.

- Kiểm tra chất lượng tiêu bản nhuộm: xem tài liệu “Kỹ thuật làm tiêu bản, nhuộm tiêu bản”.

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

## **7. An toàn**

- An toàn sinh học cấp II.
- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý bệnh phẩm và thực hiện xét nghiệm.
- Tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Thu thập mẫu**

Mủ ở các tổn thương kín trong cơ thể (mủ áp xe, dịch màng phổi, màng bụng, khớp...): lấy mẫu bằng phương pháp vô khuẩn như khi làm tiểu phẫu, sau khi sát trùng vùng da bên ngoài bằng cồn 70° và chờ khô, chọc kim hút lấy mủ, cho mủ vào lọ lấy bệnh phẩm vô khuẩn ( nắp vặn chặt) hay để nguyên ống kim hút mủ, rồi gửi ngay đến phòng xét nghiệm để được nuôi cấy ngay. Có thể lấy bệnh phẩm mủ bằng tăm bông (que gòn) rồi cho vào môi trường bảo quản Stuart hay Amies.

Mủ ở các tổn thương hở trên cơ thể (các vết thương có thể nhiễm bẩn):

- Mủ vết thương: Lau sạch vùng da lành xung quanh với cồn 70°. Lau sạch mủ trên vết thương bằng gạc vô khuẩn thấm nước muối sinh lý 0,9% vô khuẩn. Dùng tăm bông (que gòn) vô khuẩn lấy mẫu để phết lấy mủ, chất dập nát, hay mô cho vào lọ lấy bệnh phẩm vô khuẩn rồi gửi ngay đến phòng xét nghiệm để được nuôi cấy. Nếu chưa có thể gửi ngay, cho tăm bông (que gòn) đã phết mủ vào môi trường bảo quản Stuart hay Amies.

- Các nạo mủ hay mô khi phẫu thuật: cũng được lấy bằng phết tăm bông (tăm bông (que gòn)) hay trực tiếp cho mẫu vào lọ lấy bệnh phẩm vô khuẩn rồi gửi ngay đến phòng xét nghiệm. Nếu chưa có thể gửi ngay, cho vào môi trường bảo quản Stuart hay Amies.

- Các mạch lươn hay mạch dẫn: dùng tăm bông (que gòn) mảnh vô khuẩn luồn vào mạch lươn; hay pipette Pasteur nhựa hút lấy mủ cho vào lọ lấy bệnh phẩm vô khuẩn rồi gửi ngay đến phòng xét nghiệm. Nếu chưa có thể gửi ngay, cho vào môi trường vận chuyển Stuart hay Amies.

**\*Lưu ý:** phải ghi lại chính xác vị trí lấy mẫu bệnh phẩm bởi vì kết quả cấy của mẫu sẽ được lý giải khác nhau giữa những mẫu thu thập từ các vết thương bề mặt hở và từ những mẫu mủ sâu kín bên trong cơ thể.

### **b. Lưu trữ và vận chuyển mẫu**

Một cách lý tưởng là các mẫu nên được lưu trữ và vận chuyển trong các túi chứa mẫu được hàn kín, phòng xét nghiệm nên thực hiện ngay sau khi nhận được mẫu. Nếu không thực hiện xét nghiệm trong vòng 2 giờ thì mẫu bệnh phẩm nên được lưu trong ngăn mát tủ lạnh ở 4°C.

### **c. Tiêu chuẩn từ chối mẫu**

- Bệnh phẩm không có dán nhãn thông tin.
- Bệnh phẩm rò rỉ, chảy ra khỏi dụng cụ lấy mẫu.
- Bệnh phẩm lấy trên 2 giờ mà không có bảo quản.

### **d. Thực hiện xét nghiệm**

- Nhuộm Gram: xem thêm tài liệu “Kỹ thuật làm tiêu bản, nhuộm tiêu bản”, nhuộm Gram để xác định hình thể và tính chất bắt màu của vi khuẩn, nắm có trong mẫu.

**\*Lưu ý:** Nếu mẫu bệnh phẩm là que phết thì cấy trước rồi phết lên tiêu bản nhuộm Gram sau.

- Nhuộm Ziehl-Neelsen: Nếu có yêu cầu của bác sĩ hoặc khi nhuộm Gram không thấy có hình ảnh của vi khuẩn. Lưu ý với các mẫu bệnh phẩm là mủ, dịch mủ từ màng phổi, khớp, xương gập xe, hoặc các hạch bạch huyết.

- Soi tươi: Chuẩn bị mẫu soi tươi nếu nghi ngờ amip, nấm hoặc ký sinh trùng (ví dụ: *paragonimus*).

- Nuôi cấy: Cấy ngay vào các đĩa thạch phân lập như hướng dẫn ở bảng 1. Kỹ thuật cấy phải đạt được mục đích tạo được các khuẩn lạc (khóm) rời rã sau khi ủ ấm, để có thể định danh và làm kháng sinh đồ tiếp theo.

**Bảng 1:** Môi trường cấy, điều kiện và tác nhân mục tiêu

Gợi ý lâm sàng/ nhuộm Gram	Môi trường chuẩn	Ủ			Độc kết quả	Tác nhân mục tiêu
		Nhiệt độ (°C)	Không khí	Thời gian		
Tất cả	BA	35 - 37	5 - 10% CO <sub>2</sub>	40 - 48h	Hàng ngày	<i>β-haemolytic streptococci</i> <i>Pasteurella spp.</i> (vết cẩn) <i>S. aureus</i> <i>Vibriospp.</i>
	CA	35 - 37	5 - 10% CO <sub>2</sub>	40 - 48h	Hàng ngày	<i>Haemophilus spp.</i>
	MC	35 - 37	Khí thường	40 - 48h	Hàng ngày	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas</i>
Nếu thấy nấm	Thạch Sabouraud	35 - 37	Khí thường	5 ngày	Hàng ngày	Nấm

- Đối với trường hợp nghi ngờ vi khuẩn kỵ khí thì cấy thêm vào ống Thioglycollate, ủ đồng thời với các hộp thạch phân lập, nếu trên hộp thạch không có vi khuẩn mọc mà ống Thioglycollate đục, tiếp tục cấy theo quy trình cấy vi khuẩn kỵ khí.

## 9. Diễn giải và báo cáo kết quả

a. Kết quả nhuộm Gram: Mô tả bạch cầu và hình thể và tính chất bắt màu của vi khuẩn, nấm nếu có trong mẫu.

b. Kết quả nhuộm Ziehl-Neelsen: Phát hiện trực khuẩn kháng cồn acid, số lượng (nếu có).

c. Kết quả soi tươi (nếu thực hiện): Hiện diện hoặc không có hiện diện của vi sinh vật được khảo sát (ví dụ: Không tìm thấy trứng paragonimus).

d. Kết quả cấy:

- Mủ ở các tổn thương kín:

+ Nếu không phát hiện vi khuẩn gây bệnh: Trả kết quả “Không phân lập được vi khuẩn gây bệnh trong mẫu nuôi cấy”.

+ Phát hiện vi khuẩn gây bệnh: Trả kết quả “Phát hiện vi khuẩn “tên vi khuẩn” trong mẫu nuôi cấy”, trả kháng sinh đồ kèm theo.

- Mủ ở các tổn thương hở:

+ Nếu không phát hiện vi khuẩn gây bệnh: Trả kết quả “Không phân lập được vi khuẩn gây bệnh trong mẫu nuôi cấy”.

+ Phát hiện vi khuẩn gây bệnh: Trả kết quả “Phát hiện vi khuẩn “tên vi khuẩn” trong mẫu nuôi cấy”, trả kháng sinh đồ kèm theo.

+ Phát hiện mọc nhiều loại vi khuẩn, phối hợp với lâm sàng cần nhắc trả kết quả “Mẫu tạp nhiễm, yêu cầu lấy lại mẫu bệnh phẩm đúng cách”.

**\* Các vi khuẩn gây bệnh có thể gặp:**

a. Thường gặp

- *Staphylococcus aureus*

- *Coagulase-negative staphylococci*

- *Streptococcus spp.*

b. Ít gặp hơn

- Các trực khuẩn *Enterobacteriaceae*,

- *Pseudomonas* và các trực khuẩn Gram (-) không lên men,

- *Clostridium perfringens*,

- *Bacteroides* và các vi khuẩn kỵ khí khác.

c. Rất hiếm gặp

- *Bacillus anthracis*,

- *M. tuberculosis*,

- *M. ulcerans*,

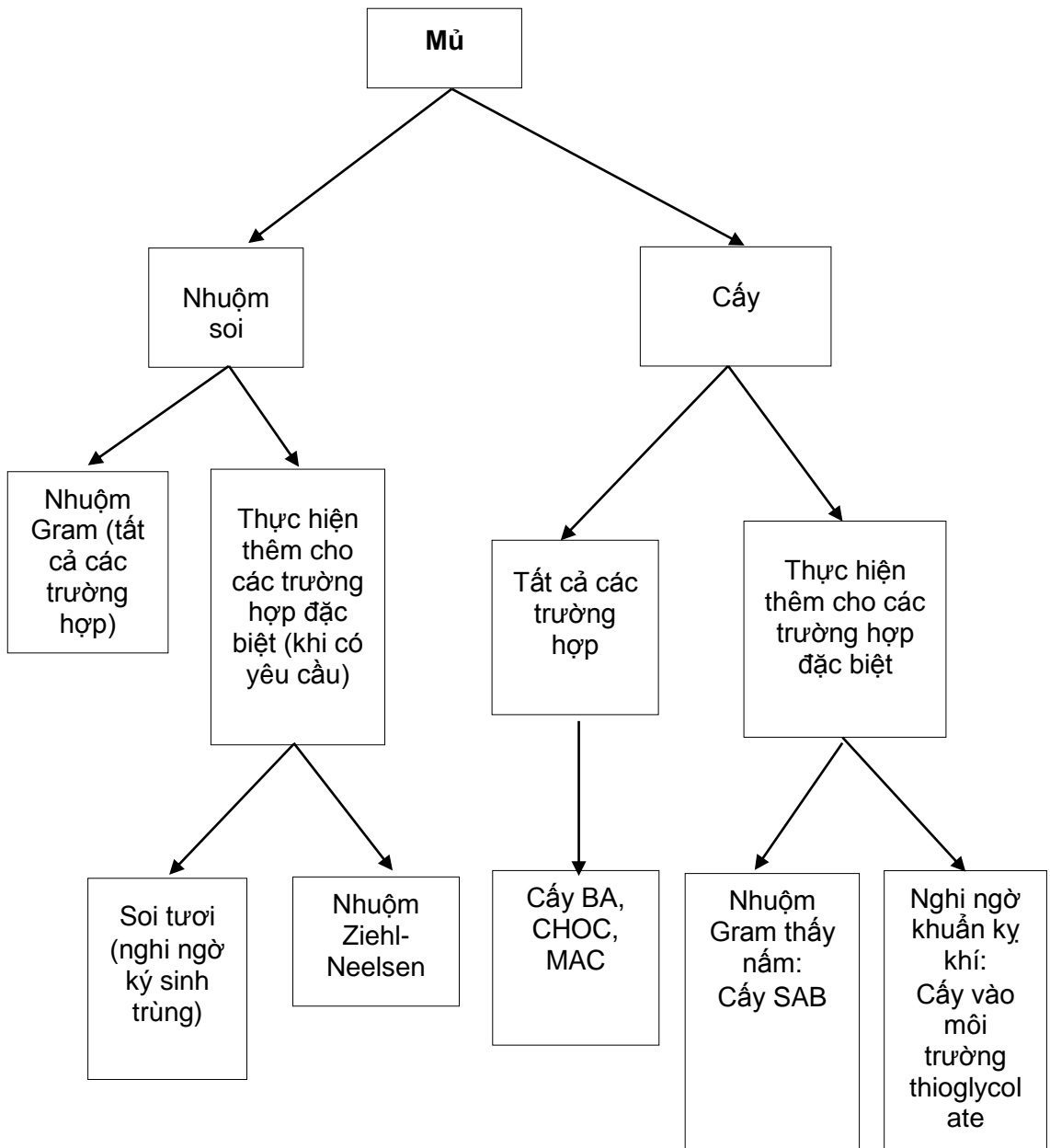
- *Pasteurella multocida*.

## **10. Lưu ý**

- Sử dụng kháng sinh trước đó có thể cho kết quả âm tính.

- Kỹ thuật này không áp dụng để cấy tìm vi khuẩn lao.

**11. Lưu trữ hồ sơ:** Theo quy định.



**Sơ đồ quy trình cấy mũ**

# QUY TRÌNH CÂY ĐỜM BẰNG KỸ THUẬT BÁN ĐỊNH LƯỢNG

## 1. Mục đích

Hướng dẫn các bước tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm đờm (đàm) bằng kỹ thuật bán định lượng.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này áp dụng cho Khoa/Phòng/Bộ phận xét nghiệm Vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện.

## 3. Trách nhiệm

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận của chuyên ngành Vi sinh Y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh Y học.

## 4. Nguyên tắc

- Kỹ thuật nuôi cấy đờm (đàm) sử dụng các môi trường thạch đĩa giàu chất dinh dưỡng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn gây bệnh. Các vi khuẩn gây bệnh được định danh dựa vào các đặc điểm về hình thái học, nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

- Sử dụng kỹ thuật cấy bán định lượng trên môi trường đặc để đánh giá số lượng vi khuẩn một cách tương đối. Bệnh phẩm được cấy thành 4 vùng, căn cứ vào từng vùng mọc của vi khuẩn để trả lời kết quả.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường 35 - 37°C
- Tủ ấm CO<sub>2</sub>/ hoặc các thiết bị tạo CO<sub>2</sub>

### b. Dụng cụ

- Pipette vô trùng
- Que cấy
- Đèn cồn



- Lam kính
- Dầu soi
- Pipet định lượng 100  $\mu$ l
- Que cấy định lượng 0,001 ml (1 $\mu$ l)
- Que cấy định lượng 0,01 ml (10 $\mu$ l)

### **c. Vật liệu**

Môi trường nuôi cấy:

- Thạch máu (BA)
- Thạch Socola (CA)
- Thạch Mac Conkey (MAC)
- Canh thang BHI tăng sinh vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí khó mọc

Hóa chất:

- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Bộ thuốc nhuộm Ziehl - Neelsen

Các chủng quốc tế ATCC:

Các chủng chuẩn quốc tế ATCC để kiểm tra chất lượng môi trường, hóa chất, sinh phẩm.

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.
- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

## **7. An toàn**

- Áp dụng các biện pháp an toàn sinh học cấp II khi xử lý bệnh phẩm và thực hiện xét nghiệm.
- Tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm.
- Sử dụng tủ an toàn sinh học cấp II để tránh nhiễm bẩn và bảo vệ nhân viên.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Chuẩn bị**

*Lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm:*

- Bệnh phẩm được lấy, vận chuyển và bảo quản theo quy định của Khoa/ Phòng/ Bộ phận xét nghiệm vi sinh.

- Bệnh phẩm đờm (đàm) là chất tiết của nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới. Bệnh phẩm đờm (đàm) có thể lấy bằng nhiều cách như:

+ Đờm (đờm (đàm)) khạc

+ Đờm (đờm (đàm)) lấy qua khí dung

+ Dịch ngoáy/rửa tị hầu

+ Dịch nội khí quản

+ Dịch rửa phế quản

+ BAL (Brochoalveolar lavage): Dịch rửa phế quản - phế nang

+ PBS (Protected brush specimens): Đờm lấy bằng bàn chải có bảo vệ

+ Đờm (đàm) lấy qua liên sườn

+ Đờm (đàm) sinh thiết phổi

- Hướng dẫn cách lấy bệnh phẩm đờm (đờm (đàm)) khạc:

+ Thời điểm đờm (đàm) khạc: Tốt nhất là lấy đờm (đờm (đàm)) vào buổi sáng sau khi bệnh nhân ngủ dậy. Hoặc khi bệnh nhân đến khám.

+ Kỹ thuật lấy đờm (đàm) khạc:

- Tốt nhất là cho bệnh nhân súc miệng bằng nước muối sinh lý vô trùng, không súc miệng bằng nước có chất sát trùng.

- Hướng dẫn bệnh nhân ngồi thẳng lưng, hít thật sâu để nín hơi vài lần rồi ho mạnh khạc đờm ra. Có thể giúp bệnh nhân khạc đờm bằng cách vỗ nhẹ vào lưng.

+ Dụng cụ chứa bệnh phẩm: Lọ nhựa vô trùng có nắp xoáy. Trên dụng cụ chứa phải được dán nhãn có đầy đủ thông tin đúng bệnh nhân, ngày và thời điểm lấy bệnh phẩm.

+ Thể tích: Lấy khoảng 1-5 ml. Kiểm tra số lượng và chất lượng đờm (đàm), tránh lẫn nước bọt.

+ Vận chuyển: Gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt vì các tác nhân gây bệnh ở đờm (đàm) có thể bị vi hệ mọc lẫn ất.

+ Bảo quản: Nếu chưa gửi ngay, bảo quản ở nhiệt độ 2 - 4°C nhưng không quá 4 tiếng.

*Tiếp nhận bệnh phẩm:*

- Quan sát tình trạng của dụng cụ chứa bệnh phẩm.

- Quan sát điều kiện bảo quản và thời gian vận chuyển phù hợp.

- Đối chiếu các thông tin trên phiếu chỉ định xét nghiệm và lọ chứa bệnh phẩm.

Bổ sung phần còn thiếu (nếu có) vào phiếu yêu cầu. Thông tin về chẩn đoán bệnh giúp xử lý bệnh phẩm tốt hơn.

- Ghi nhận ngày nhận mẫu, thời điểm nhận mẫu và người nhận.

*Các tiêu chí từ chối bệnh phẩm:*

- Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định.

- Trong một số trường hợp đặc biệt, bệnh phẩm đờm (đờm (đàm)) không đảm bảo chất lượng vẫn có thể nuôi cấy nhưng báo ngay với bác sỹ lâm sàng về mức độ kém chính xác của kết quả.

### **b. Các bước thực hiện**

Xử lý bệnh phẩm càng sớm càng tốt. Sử dụng tủ an toàn sinh học để tránh lây nhiễm các tác nhân lây qua đường hô hấp cho nhân viên.

Quan sát bệnh phẩm và lưu số.

Bệnh phẩm tốt nhất là có trạng thái nhầy mù, số lượng 2ml.

Nhuộm soi:

- Chọn phần bệnh phẩm đờm (đàm) có dịch máu hoặc mù để làm tiêu bản.

- Nhuộm Gram:

+ Đánh giá số lượng TBBM và BCĐN:

- Soi tiêu bản dưới vật kính 10X/20-40 vi trường.

- Đếm số lượng TBBM và BCĐN/1 vi trường.

- Bệnh phẩm đờm (đàm) đạt yêu cầu có < 10 TBBM/ 1 vi trường.

- Nếu chất lượng bệnh phẩm đờm (đàm) không đạt yêu cầu, bệnh phẩm đờm (đàm) toàn nước bọt, phải thông báo ngay với bác sỹ lâm sàng và đề nghị lấy lại bệnh phẩm.

+ Đánh giá vi khuẩn:

- Soi vật kính 100X/ 20-40 vi trường.

- Mô tả loại vi khuẩn chiếm ưu thế về hình thể, kích thước, cách sắp xếp, tính chất bắt màu của vi khuẩn.

- Nhuộm Ziehl - Neelsen dịch não tủy: phát hiện trực khuẩn kháng acid (AFB)

Chuẩn bị tiêu bản và tiến hành nhuộm theo quy trình.

*Nuôi cấy:*

- Chỉ cấy những bệnh phẩm đờm (đàm) đạt tiêu chuẩn < 10 TBBM/1 vi trường.

- Sử dụng que cấy vô trùng cấy bệnh phẩm lần lượt vào đĩa thạch CA, BA, MAC.

- Cách cấy phân vùng thành 4 vùng:

+ Vùng 1: Ria cấy ¼ thứ nhất của đĩa thạch, đốt ăng.

+ Vùng 2: Ria từ ¼ thứ nhất sang ¼ thứ 2 của đĩa thạch, đốt ăng.

+ Vùng 3: Ria từ ¼ thứ 2 sang ¼ thứ 3 của đĩa thạch, đốt ăng.

+ Vùng 4: Ria từ ¼ thứ 3 sang ¼ thứ 4 của đĩa thạch, đốt ăng.

- Phát hiện sơ bộ nhanh *Haemophilus* bằng cách cấy thêm một nốt *S. aureus* ATCC 25922 vào đĩa thạch máu để làm thử nghiệm vệ tinh.

- Phát hiện sơ bộ nhanh *S. pneumoniae* bằng cách đặt thêm 1 khoanh giấy optochin vào đĩa thạch máu để làm thử nghiệm optochin.

- Phát hiện sơ bộ nhanh *S. pyogenes* bằng cách đặt thêm 1 khoanh giấy bacitracin 10-U vào đĩa thạch máu để làm thử nghiệm bacitracin.

*Lưu giữ bệnh phẩm đờm (đờm (đàm)):*

Có thể lưu giữ bệnh phẩm dịch não tủy ở 4°C và/ hoặc ở - 20°C trong những trường hợp cần thiết, ví dụ cho các xét nghiệm sử dụng kỹ thuật PCR

*Ủ ấm:*

- Ủ ấm thạch BA và CA ở 35-37°C trong khí trường 5% CO<sub>2</sub>/ 48-72 giờ.

- Ủ ấm thạch MAC ở 35-37°C trong khí trường thường/48-72 giờ.

*Đọc đĩa thạch sau khi ủ ấm:*

- Quan sát bằng mắt thường sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ trên tất cả các đĩa thạch.

- Nếu thấy vi sinh vật phát triển:

+ Thông báo ngay cho bác sĩ về kết quả chẩn đoán sơ bộ vi sinh vật dựa vào hình thái và khuẩn lạc (khóm).

+ Tiến hành định danh vi sinh vật.

- Ước tính số lượng vi khuẩn gây bệnh (bán định lượng)

+ Nếu mọc ở vùng thứ 1 thì số lượng vi khuẩn 1+: vi khuẩn mọc rất ít

+ Nếu mọc ở vùng thứ 2 thì số lượng vi khuẩn 2+: vi khuẩn mọc ít

+ Nếu mọc ở vùng thứ 3 thì số lượng vi khuẩn 3+: vi khuẩn mọc nhiều

+ Nếu mọc ở vùng thứ 4 thì số lượng vi khuẩn 4+: vi khuẩn mọc rất nhiều

- Nếu không thấy vi sinh vật phát triển, tiếp tục ủ ấm thêm.

+ Quan sát đĩa môi trường hàng ngày trong 4 ngày.

+ Nếu kết quả nhuộm Gram từ bệnh phẩm có vi sinh vật nhưng không thấy mọc khuẩn lạc (khóm) hoặc chỉ định yêu cầu cấy nấm, ủ ấm tất cả các đĩa thạch ít nhất 1 tuần.

*Định danh vi khuẩn và thực hiện kháng sinh đồ:*

- Định danh tất cả các vi sinh vật phát triển trên môi trường. Xác định chi và loài của các tác nhân gây ở bệnh dịch não tủy trong vòng 2 giờ sau khi quan sát thấy khuẩn lạc (khóm):

- + Nhuộm Gram khuẩn lạc (khóm).
- + Quan sát hình thái khuẩn lạc (khóm).
- + Xác định tính chất sinh vật hóa học của vi sinh vật bằng bộ sinh vật hóa học, máy định danh tự động/Hoặc định danh vi sinh vật bằng máy định danh khối phổ.
- Thực hiện kháng sinh đồ đối với vi khuẩn/ vi nấm gây bệnh.

*Đọc kết quả:*

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn/vi nấm được coi là gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn/vi nấm đến mức độ chi và/hoặc loài.

- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn/vi nấm gây bệnh.

*Các vi sinh vật gây viêm phổi thường gặp:*

<b>Viêm phổi cộng đồng</b>	<b>Viêm phổi bệnh viện</b>	<b>Viêm phổi ở người suy giảm miễn dịch</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> , gồm cả MRSA	Các trực khuẩn Gram âm, gồm cả <i>Pseudomonas aeruginosa</i> và các vi khuẩn không lên men	Các trực khuẩn Gram âm, gồm cả <i>Pseudomonas aeruginosa</i> và các vi khuẩn không lên men
<i>Haemophilus influenzae</i>	Các vi khuẩn kỵ khí	Các vi khuẩn kỵ khí
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Rhodococcus equi</i>
Các vi khuẩn kỵ khí		<i>Pneumocystis jirovecii</i>
<i>Pasteurella</i> spp.		Vi nấm
<i>Legionella</i> spp.		AFB
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		Các virus
<i>Chlamydia pneumoniae</i>		
<i>Chlamydia psittaci</i>		
<i>Norcadia</i> spp.		
Các virus đường hô hấp		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (bệnh nhân HIV)		
Các vi khuẩn khác ( <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Brucella</i> spp., <i>Franciella tularensis</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Burkholderia mallei</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i> )		
<i>Mycobacteria tuberculosis</i>		

*Lưu giữ đĩa môi trường và vi khuẩn nuôi cấy dương tính:*

- Lưu giữ các đĩa môi trường nuôi cấy dương tính theo qui định của khoa/Phòng Bộ phận Vi sinh

- Lưu giữ lâu dài các chủng phân lập được trong tủ lạnh âm sâu.

## 9. Báo cáo kết quả

- Báo cáo kết quả nhuộm Gram càng sớm càng tốt:

+ Thông báo cho các khoa lâm sàng và đề nghị lấy lại bệnh phẩm nếu đờm (đờm (đám)) toàn nước bọt, chất lượng đờm (đờm (đám)) không đạt yêu cầu (> 10 TBBM)

+ Báo cáo kết quả nuôi cấy sơ bộ chi và/ hoặc loài càng sớm càng tốt, trong khi tiếp tục tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

- Báo cáo dương tính khi vi khuẩn được coi là gây bệnh, phù hợp lâm sàng:

+ Báo cáo kết quả định danh vi khuẩn/ vi nấm gây bệnh đến mức độ chi và/hoặc loài theo đúng qui định.

+ Báo cáo số lượng vi khuẩn/vi nấm nuôi cấy bán định lượng 1+; hoặc 2+; hoặc 3+; hoặc 4+

Vi sinh vật	Số lượng (Bán định lượng)	Nhận định
<i>Các vi khuẩn có thể thuộc vi hệ bình thường</i>		
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Số lượng bất kỳ	Định danh/Chỉ làm KSD cho bệnh nhân dị ứng penicillin
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Số lượng ≤ Vi hệ	Không báo cáo kết quả
	Số lượng > Vi hệ	Định danh và làm KSD
<i>Staphylococcus aureus</i>	Số lượng ≤ Vi hệ	Không báo cáo kết quả (trừ MRSA)
	Số lượng > Vi hệ	Định danh và làm KSD
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Số lượng ≤ Vi hệ	Không báo cáo kết quả
	Số lượng > Vi hệ	Định danh và làm KSD
<i>Haemophilus influenzae</i>	Số lượng ≤ Vi hệ	Không báo cáo kết quả
	Số lượng > Vi hệ	Định danh và làm KSD, beta-lactamase
<i>Neisseria meningitidis</i>	Số lượng ≤ Vi hệ	Không báo cáo kết quả
	> Vi hệ	Định danh và làm KSD, beta-lactamase

Vi sinh vật	Số lượng (Bán định lượng)	Nhận định
<i>Streptococcus</i> group B, C, G	Số lượng ≤ Vi hệ	Không báo cáo kết quả
	> Vi hệ	Định danh và làm KSD
Các vi khuẩn khác thuộc vi hệ bình thường	Không áp dụng	Không báo cáo kết quả
		Định danh và làm KSD nếu thuận
<b>Các tác nhân gây bệnh nguy hiểm</b>		
<i>Brucella</i>	Số lượng bất kỳ	Định danh theo hướng dẫn của CDC. Tiến hành trong tủ an toàn sinh học cấp II
<i>Franciella tularensis</i>		
<i>Yersinia pestis</i>		
<i>Bacillus anthracis</i>		
<b>Các trực khuẩn Gram âm</b>		
<i>Pasteurellas</i> spp.	Số lượng > Vi hệ	Định danh và làm KSD
<i>Enterobacteriaceae</i>	Một hoặc hai loại Số lượng ≤ Vi hệ	Không báo cáo kết quả (trừ bệnh nhân ICU hoặc suy giảm miễn dịch)
	Một hoặc hai loại Số lượng > Vi hệ	Định danh và làm KSD
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Số lượng bất kỳ	Định danh và làm KSD
Các vi khuẩn không lên men khác ( <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Burkholderia cepacia</i> ...)	Số lượng ≤ Vi hệ	Định danh và làm KSD
	Số lượng > Vi hệ	
> 2 loại trực khuẩn Gram âm, > 2 loại hình thái khác nhau	Số lượng ≤ Vi hệ	Không báo cáo kết quả
	Số lượng > Vi hệ	Định danh có chọn lọc cho bệnh nhân ICU hoặc suy giảm miễn dịch, lưu giữ chủng và làm KSD khi bác sỹ yêu cầu
<b>Các trực khuẩn Gram dương</b>		
<i>Corynebacterium</i> spp.	Số lượng ≤ Vi hệ	Không báo cáo kết quả
	Số lượng > Vi hệ	Định danh và làm KSD
<i>Rhodococcus equi</i>	Số lượng bất kỳ	Định danh và làm KSD

Vi sinh vật	Số lượng (Bán định lượng)	Nhận định
<i>Actinomycetes</i> hiếu khí ( <i>Nocardia</i> spp., <i>Streptomyces</i> )	Số lượng bất kỳ	Định danh và làm KSD
<b>Nấm men</b>		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Số lượng bất kỳ	Định danh
<b>Nấm sợi</b>		
Các loài nấm sợi ( <i>Aspergillus</i> spp., <i>Mucor</i> spp., ...)	Số lượng bất kỳ	Định danh

- Báo cáo Âm tính nếu tất cả các đĩa môi trường không mọc khuẩn lạc (khóm):

Báo cáo “Không mọc vi khuẩn/ vi nấm gây bệnh”. Hoặc báo cáo “Vi hệ đường hô hấp trên”.

## 10. Diễn giải kết quả

Vi sinh vật mọc với số lượng được coi là gây bệnh khi:

- Khuẩn lạc (khóm) của vi khuẩn/vi nấm gây bệnh mọc tương đối nhiều và rất nhiều ở vùng thứ 2, và/ hoặc vùng thứ 3, và/ hoặc vùng thứ 4.

- Khuẩn lạc (khóm) của vi khuẩn/ vi nấm gây bệnh mọc ở vùng 1 nhưng phù hợp với hình ảnh trên tiêu bản nhuộm Gram và có bạch cầu đa nhân trung tính. Hoặc trên tiêu bản nhuộm Gram có rất ít hoặc không có các vi hệ của đường hô hấp nhưng có rất nhiều tế bào mũ..

## 11. Hạn chế

- Một số vi sinh vật gây viêm phổi không mọc trên môi trường nuôi cấy thông thường (ví dụ: *Legionella*, virus, vi nấm, *Mycoplasma*, *Mycobacteria*).

- Âm tính giả có thể do lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm không đúng qui định hoặc bệnh nhân đã điều trị kháng sinh từ trước.

- Dương tính giả có thể do bệnh phẩm bị vi hệ cư trú ở đường hô hấp trên mọc lẫn át vi khuẩn gây bệnh hoặc bệnh phẩm bị nhiễm bản từ dụng cụ chứa bị nứt vỡ.

## 12. Lưu ý (cảnh báo)

- Quy trình này chỉ áp dụng để nuôi cấy vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ mọc, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.



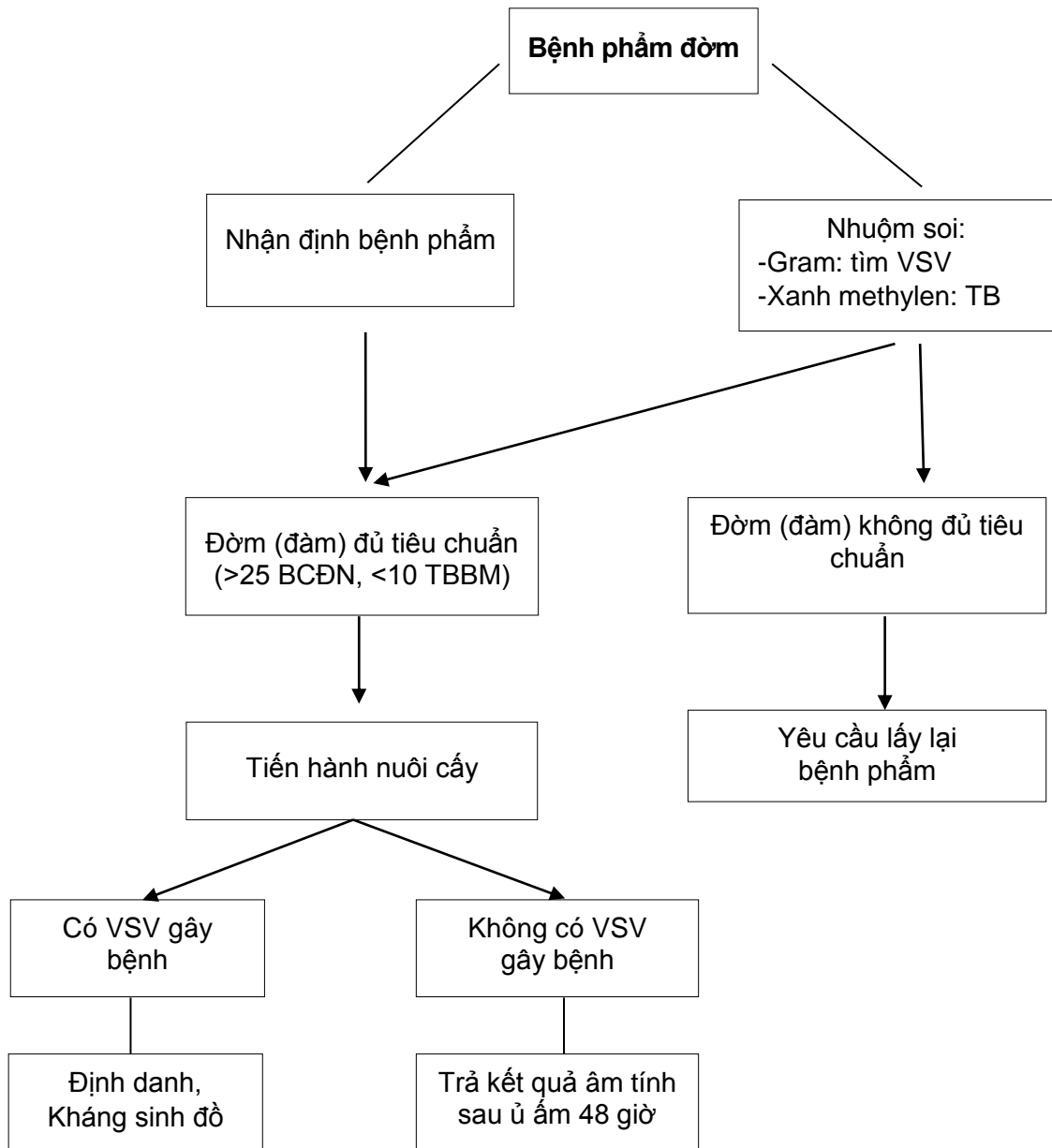
- Nếu bác sỹ lâm sàng có yêu cầu tìm vi khuẩn gây bệnh hiếm gặp, vi nấm gây bệnh phải ghi cụ thể để tránh bỏ sót.

- Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng yêu cầu có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

### 13. Lưu trữ hồ sơ

Tất cả hồ sơ được lưu trữ theo qui định phù hợp với Khoa/Phòng/Bộ phận vi sinh của từng bệnh viện

#### Sơ đồ quy trình cấy đờm



# QUY TRÌNH CÂY NƯỚC TIỂU

## 1. Mục đích

Quy trình cây nước tiểu hướng dẫn cách thực hiện nuôi cấy, định lượng và định danh một số vi sinh vật thường gây nhiễm trùng đường tiết niệu.

## 2. Phạm vi áp dụng

- Quy trình này áp dụng cho Khoa/Phòng/Bộ phận xét nghiệm Vi sinh khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm nước tiểu.

- Áp dụng cho các bệnh phẩm nước tiểu được thu thập từ bệnh nhân có triệu chứng nhiễm trùng đường tiết niệu hay từ bệnh nhân có các yếu tố nguy cơ nhiễm trùng đường tiết niệu.

- Bệnh phẩm nước tiểu bao gồm các loại sau: nước tiểu giữa dòng, nước tiểu lấy qua ống dẫn lưu, chọc hút trên xương mu, nước tiểu lấy từ thận, niệu quản, bàng quang qua can thiệp phẫu thuật, thủ thuật.

## 3. Trách nhiệm

- Khoa lâm sàng thu thập mẫu nước tiểu đúng theo hướng dẫn và vận chuyển mẫu để có được bệnh phẩm tốt nhất cho nuôi cấy. Thông tin loại mẫu thu thập cần phải thể hiện trong phiếu xét nghiệm đi kèm để phòng xét nghiệm có căn cứ biện luận kết quả nuôi cấy.

- Phòng xét nghiệm có nhiệm vụ nhận, kiểm tra và tiến hành xét nghiệm mẫu theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên lý

Sử dụng phương pháp cấy định lượng và các môi trường thạch dinh dưỡng nhằm phát hiện vi khuẩn hiện diện trong nước tiểu. Số lượng vi khuẩn gây bệnh này tùy theo từng loại bệnh phẩm nước tiểu thu thập được.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học

- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO<sub>2</sub>
- Máy ly tâm tế bào (nếu có)

### **b. Dụng cụ**

- Pipette vô trùng
- Que cấy 1 μL
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

### **c. Vật liệu**

*Môi trường nuôi cấy:*

- Thạch máu
- Thạch MacConkey
- Thạch chọn lọc cho nuôi cấy nước tiểu (Uriselect, Chromogenic agar...) nếu có

*Hóa chất:*

Bộ thuốc nhuộm Gram

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.
- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

## **7. An toàn**

- An toàn sinh học cấp II.
- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý bệnh phẩm và thực hiện xét nghiệm.
- Tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Chuẩn bị**

*Lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm:*

*Cách thu thập mẫu nước tiểu:*

- ✓ Nước tiểu giữa dòng:

Đây là loại nước tiểu thường thu thập gửi đến phòng xét nghiệm nhất. Thời điểm lấy tốt nhất là vào buổi sáng, lúc này vi khuẩn đã có thời gian sinh sôi trong đêm tại bàng quang. Lưu ý cần phải loại bỏ (khoảng 30 ml) phần nước tiểu đầu dòng vì phần này thường bị ngoại nhiễm các vi khuẩn thường trú tại vùng niệu-sinh dục. Lượng nước tiểu 30 ml sau đó được lấy vào lọ vô trùng miệng rộng (thể tích khoảng 50ml). Đậy chặt nắp lọ sau khi lấy xong.

✓ Lấy nước tiểu qua ống dẫn lưu:

Bệnh nhân có ống dẫn lưu nước tiểu là đối tượng có nguy cơ cao mắc nhiễm trùng đường tiết niệu.

Để tránh ngoại nhiễm, cần sát trùng vùng catheter rút nước tiểu bằng alcohol 90<sup>0</sup>, rút nước tiểu bằng kim tiêm vô trùng.

Lưu ý: không thu thập nước tiểu trong túi chứa nước tiểu và đầu catheter ống dẫn lưu nước tiểu để nuôi cấy thường có nhiều vi khuẩn thường trú tăng sinh.

✓ Lấy nước tiểu qua chọc hút trên xương mu, từ thận, niệu quản, bàng quang qua can thiệp phẫu thuật, thủ thuật: Đây là các phương pháp khá xâm lấn để thu thập nước tiểu mà không bị ngoại nhiễm. Kết quả nuôi cấy từ bệnh phẩm này phản ánh khá chính xác tình trạng nhiễm trùng tiểu.

*Vận chuyển và bảo quản mẫu*

- Mẫu nước tiểu cần được đưa xuống phòng xét nghiệm ngay trong vòng 2 giờ để nuôi cấy.

- Nếu không thể vận chuyển được ngay đến phòng xét nghiệm thì giữ trong ngăn mát tủ lạnh 4<sup>0</sup> C trong vòng 18 giờ.

*Tiêu chuẩn từ chối mẫu:*

- Bệnh phẩm không có dán nhãn thông tin.

- Bệnh phẩm rò rỉ, chảy ra khỏi dụng cụ chứa bệnh phẩm.

- Bệnh phẩm là đầu catheter ống dẫn lưu nước tiểu.

- Nước tiểu đựng trong môi trường tăng sinh.

- Nước tiểu trên 48 giờ (nếu không bảo quản trong môi trường acid boric).

## **b. Quy trình xử lý mẫu**

- Phòng vi sinh tiếp nhận và xử lý ngay các mẫu nước tiểu. Nếu không thể tiến hành xét nghiệm ngay thì cần giữ trong tủ lạnh ở 4°C.

- Quá trình xét nghiệm mẫu nước tiểu bao gồm các bước sau:

*Bước 1: Thực hiện một mẫu nhuộm Gram*

- Đây là bước ban đầu để xét nghiệm mẫu nước tiểu, phòng xét nghiệm có thể quyết định thực hiện để khảo sát sự hiện diện của vi khuẩn và tế bào trong mẫu hay bỏ qua nếu không có điều kiện. Dùng pipette Pasteur trộn đều mẫu nước tiểu và hút 1 giọt

nhỏ lên lame kính, không dàn đều ra. Làm khô mẫu bằng nhiệt và nhuộm Gram. Soi mẫu dưới kính hiển vi dầu có độ phóng đại 100x, tìm sự hiện diện của vi khuẩn, bạch cầu đa nhân và tế bào biểu mô.

- Nếu thấy > 10 vi khuẩn/vi trường, số lượng vi khuẩn trong mẫu nước tiểu tương đương >  $10^5$  /ml.

- Nếu thấy > 10 tế bào bạch cầu đa nhân/vi trường: đây là dấu hiệu chứng tỏ tình trạng nhiễm trùng tiết niệu.

- Nếu có nhiều tế bào biểu mô trong mẫu nước tiểu của bệnh nhân nữ, bất kể số lượng vi khuẩn: đây là dấu hiệu mẫu nước tiểu bị nhiễm vi khuẩn thường trú vùng âm hộ, âm đạo.

- Nếu có yêu cầu kết quả khẩn cấp, kết quả nhuộm Gram cần gửi ngay cho bác sĩ điều trị kèm ghi chú “Kết quả nuôi cấy sẽ được trả sau”.

### *Bước 2: Sàng lọc*

Cách 1: Sàng lọc dựa trên kết quả soi lame: nếu soi nhuộm Gram không có vi khuẩn và bạch cầu: mẫu nước tiểu được đánh giá là không nhiễm trùng, vì vậy không cần phải tiến hành nuôi cấy.

Cách 2: Dùng que nhúng phát hiện nhanh leukocyte esterase hay nitrate (que nhúng test nhanh Tổng phân tích nước tiểu).

Nếu kết quả test nhanh phát hiện có men leukocyte esterase hay nitrate + có vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm >  $10^5$ /ml: cần nuôi cấy mẫu nước tiểu ngay để tránh vi khuẩn ngoại nhiễm tăng sinh.

Nếu kết quả test nhanh không phát hiện men leukocyte esterase hay nitrate + không có vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm: trả kết quả test sàng lọc nhiễm trùng tiểu âm tính, không cần thiết phải nuôi cấy.

**\*Lưu ý:** test nhúng nước tiểu có thể không đủ nhạy để phát hiện nếu mẫu nước tiểu có lượng vi khuẩn dưới  $10^5$ /ml.

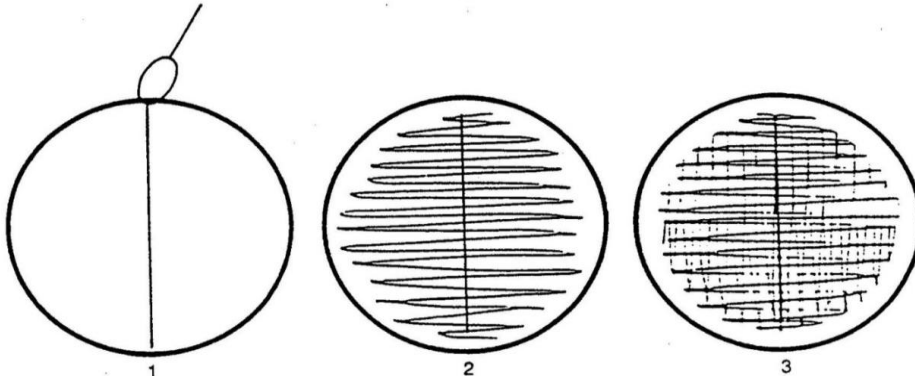
Có thể bỏ qua bước thực hiện que nhúng phân tích nước tiểu nếu phòng xét nghiệm chưa trang bị được

### *Bước 3: Nuôi cấy nước tiểu định lượng*

Dùng que cấy 1µl để lấy nước tiểu và thực hiện nuôi cấy định lượng trên môi trường Blood agar và MacConkey agar.

- Lắc nhẹ mẫu nước tiểu cho đều, cho que cấy 1 µl chạm vào mẫu nước tiểu theo chiều thẳng đứng. Lưu ý không nhúng cả que cấy vào sâu trong mẫu nước tiểu.

- Dùng que cấy đã lấy nước tiểu vạch 1 đường giữa đĩa thạch (hình 1), ria đường zig-zag gần nhau cắt ngang qua đường giữa (hình 2), vạch những đường song song với đường zig-zag (hình 3)



- Tiến hành tương tự cấy trên thạch MacConkey.
- Ủ các đĩa cấy ở 35°C qua đêm.
- Lưu ý: Có thể thay thế môi trường nuôi cấy blood agar và MacConkey bằng môi trường chọn lọc cho nước tiểu (ví dụ như CLED agar, ...)

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

- Nếu không có khuẩn lạc (khóm) mọc trên các môi trường thạch: Trả kết quả Nuôi cấy nước tiểu âm tính.
- Nếu có vi khuẩn mọc trên thạch, biện luận kết quả như sau:

### a. Biện luận kết quả cấy nước tiểu định lượng

- Trường hợp 1:
  - + Vi khuẩn nuôi cấy < 10 CFU/đĩa: lượng vi khuẩn tương đương < 10<sup>4</sup> CFU/ml: Trả kết quả Không phát hiện vi khuẩn gây nhiễm trùng tiểu.
  - + Ngoại lệ: Thực hiện định danh và kháng sinh đồ cho vi khuẩn < 10<sup>4</sup> CFU/ml ở những trường hợp sau: mẫu nước tiểu lấy từ bàng quang qua sinh thiết trên xương mu, qua nội soi bàng quang, trên bệnh nhân nữ có triệu chứng nhiễm trùng tiểu rõ, mẫu nước tiểu có tế bào mũ.
- Trường hợp 2:
  - + Vi khuẩn nuôi cấy có lượng từ 10-100 khuẩn lạc (khóm) /đĩa tương đương với 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> CFU/ml. Biện luận như sau:
    - + Nếu bệnh nhân không có triệu chứng nhiễm trùng tiết niệu: đề nghị lấy 1 mẫu nước tiểu nữa và tiến hành nuôi cấy định lượng lại.
    - + Nếu bệnh nhân có triệu chứng nhiễm trùng tiết niệu + mẫu cấy có 1 hay 2 loại vi khuẩn: tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ.
    - + Nếu bệnh nhân không có triệu chứng nhiễm trùng tiết niệu, hay triệu chứng không rõ ràng, kết quả soi đếm bạch cầu, vi khuẩn ít: trả kết quả số lượng CFU + đề nghị lấy 1 mẫu nước tiểu nữa và tiến hành nuôi cấy định lượng lại.

- Trường hợp 3: Số lượng vi khuẩn > 10<sup>5</sup> CFU/ml + mẫu cấy có 1-2 loại vi khuẩn: Thông báo số lượng và hội chẩn với bác sĩ điều trị, từ đó có thể tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ khi có yêu cầu.

- Trường hợp 4: Nếu mẫu cấy có có trên 2 loại vi khuẩn ở trường hợp 2 và 3: báo cáo kết quả: “Mẫu tạp nhiễm, yêu cầu lấy lại mẫu nước tiểu đúng cách.”

**b Định danh và thực hiện kháng sinh đồ** với các chủng nuôi cấy đạt số lượng gây bệnh (hay có khả năng là tác nhân gây nhiễm trùng tiết niệu trên lâm sàng).

**c Các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong nhiễm trùng tiết niệu**

*Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Streptococcus, Enterococcus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus (phụ nữ trẻ).*

**10. Lưu ý (cảnh báo)**

- Luôn trả kết quả định danh và kháng sinh đồ *Burkholderia pseudomallei* và *Streptococcus* group B ở bất cứ số lượng nào.

- Nấm hạt men phân lập từ nước tiểu lấy qua catheter: thực hiện xét nghiệm sinh ống mầm và trả kết quả định danh, đề nghị cân nhắc rút catheter.

**11. Lưu trữ hồ sơ**

Lưu trữ theo quy định.

# QUY TRÌNH CẤY PHÂN

## 1. Mục đích

Quy trình hướng dẫn cách thu thập bệnh phẩm, vận chuyển và nuôi cấy mẫu phân trong phòng xét nghiệm vi sinh.

## 2. Phạm vi áp dụng

- Quy trình này áp dụng cho khoa/phòng xét nghiệm Vi sinh khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm.

- Nuôi cấy vi khuẩn thường gây bệnh trong phân: *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*. Các đĩa môi trường nuôi cấy sử dụng cho các vi khuẩn trên đồng thời cũng có tính năng nuôi cấy luôn một số vi khuẩn gây bệnh nhiễm trùng tiêu hóa nhưng ít gặp như: *Aeromonas hydrophila* và *Plesiomonas shigelloides*...

- Tài liệu không đề cập nuôi cấy phân lập vi khuẩn kỵ khí như *Clostridium difficile* và *Campylobacter sp.*

## 3. Trách nhiệm

- Khoa lâm sàng thu thập mẫu phân đúng theo hướng dẫn và vận chuyển mẫu để có được bệnh phẩm tốt nhất cho nuôi cấy. Thông tin loại mẫu thu thập cần phải thể hiện trong phiếu xét nghiệm đi kèm để phòng xét nghiệm có căn cứ biện luận kết quả nuôi cấy.

- Phòng xét nghiệm có nhiệm vụ nhận, kiểm tra và tiến hành xét nghiệm mẫu theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên lý

Sử dụng các môi trường chuyên biệt, chọn lọc để nuôi cấy, tăng sinh, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh trong phân.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO<sub>2</sub>/hoặc thiết bị tạo CO<sub>2</sub>



## **b. Dụng cụ**

- Pipette vô trùng
- Que cấy
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

## **c. Vật liệu**

*Môi trường nuôi cấy:*

- Thạch máu
- Thạch MacConkey
- Thạch TCBS, MEA, SS, XLD,
- Môi trường tăng sinh: Alkaline pepton, Selenite F

*Hóa chất:*

- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Các bộ phản ứng sinh hóa, định danh: KIA, API 20E, API 20NE, VITEK ID card.
- Các bộ ngưng kết serogroup, antigen của các vi khuẩn gây bệnh đường ruột.

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

## **7. An toàn**

- An toàn sinh học cấp II.
- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý bệnh phẩm và thực hiện xét nghiệm.
- Tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Chuẩn bị**

*Lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm:*

*Cách thu thập mẫu phân:*

- Thu thập mẫu phân (đặc, nhầy, nước) vào lọ vô trùng 40ml có nắp đậy chặt, chú ý lấy phần phân nhầy máu vì có khả năng chứa nhiều vi khuẩn gây bệnh.

- Không khuyến cáo lấy mẫu phân bằng que phết trực tràng vì không đủ lượng bệnh phẩm để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn gây bệnh. Tuy nhiên trong trường hợp bệnh nhân không tự đi tiêu được, que phết trực tràng có thể được sử dụng để lấy mẫu phân nuôi cấy.

- Nên lấy phân cấy trước khi dùng kháng sinh.

*Vận chuyển và bảo quản mẫu:*

- Bệnh phẩm phải được vận chuyển ngay đến phòng xét nghiệm không quá 2 giờ. Nếu để quá lâu, số lượng vi khuẩn phân lập trong mẫu phân sẽ giảm đi do độ pH của mẫu phân giảm dần theo thời gian. Nếu là mẫu phân cần soi cấy vi khuẩn tả thì phải chuyển ngay đến phòng xét nghiệm trong vòng 30 phút.

- Nếu không chuyển mẫu đến phòng xét nghiệm trong thời gian quy định thì phải giữ mẫu phân trong môi trường chuyên chở. Các môi trường thường được dùng là: Stuart's, Cary-Blair... Mẫu phân tả cần giữ trong môi trường alkaline pepton.

### **b. Tiêu chuẩn từ chối mẫu**

- Bệnh phẩm không có dán nhãn thông tin.

- Bệnh phẩm rò rỉ, chảy ra bao đựng

- Mẫu phân đựng trong môi trường chứa F2AM, barium, có lẫn nước tiểu.

- Không khuyến cáo giữ phân trong tủ lạnh vì một số vi khuẩn (ví dụ như *Shigella*) sẽ chết ở nhiệt độ thấp.

### **c. Quy trình xử lý mẫu**

*Quan sát đại thể:*

Ghi nhận tính chất phân. Phân nhầy máu thường do các tác nhân tiêu chảy xâm lấn như *Salmonella*, *Shigella*... Phân nước trắng đục như nước vo gạo gợi ý nhiễm vi khuẩn tả (*Vibrio cholerae*).

*Nuôi cấy:*

- Nên chọn phần phân nhầy, máu để nuôi cấy. Dùng que cấy lấy một khối lượng phân, chú ý nên chọn phần có nhầy, máu để ria cấy trên môi trường.

- Tùy vào mục đích cần phân lập tác nhân nào mà chọn môi trường nuôi cấy cho phù hợp. Quy trình này hướng dẫn cách nuôi cấy *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas* và *Aeromonas*.

- Môi trường thường sử dụng:

+ Nuôi cấy *Vibrio cholerae*: Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar (TCBS), Meat-extract agar (MEA), tăng sinh trong dung dịch Alkaline pepton .

+ Nuôi cấy các vi khuẩn khác: Blood agar (BA), MacConkey agar (MC), *Salmonella-Shigella* agar (SS) hay Xylose lysine deoxycholate agar (XLD), tăng sinh trong dung dịch Selenite broth.

+ Các môi trường thạch được ủ ở 37°C, đọc kiểm tra sau 18-24 giờ, 48 giờ.

+ Môi trường tăng sinh (alkaline pepton, selenite broth) được cấy chuyển ra thạch sau 18-24 giờ. Cấy chuyển môi trường pepton kiểm tra đĩa TCBS hay MEA, cấy chuyển Selenite broth ra đĩa *Salmonella-Shigella* (SS) hay đĩa XLD.

*Biện luận đọc môi trường nuôi cấy:*

Định danh *Salmonella* và *Shigella*:

- Sau mỗi 24 giờ nuôi cấy, kiểm tra đĩa MacConkey và *Salmonella-Shigella* để tìm khuẩn lạc (khóm) không lên men lactose và khuẩn lạc (khóm) sinh H<sub>2</sub>S. Đây là các khuẩn lạc (khóm) nghi ngờ thuộc chi *Salmonella* sp. và *Shigella* sp. Tuy nhiên, đây cũng có thể là vi khuẩn họ đường ruột thường trú trong đường tiêu hóa. Vì vậy, cần phải tiến hành một số phương pháp trắc nghiệm sinh hóa hay định danh cho các khuẩn lạc (khóm) này.

Khuẩn lạc (khóm) nghi ngờ *Salmonella*, *Shigella* cần làm một số thử nghiệm xác định tính chất sinh vật hóa học.

**Bảng 1:** Tính chất sinh hóa thường gặp của *Salmonella* và *Shigella*

Vi khuẩn	Oxidase	Glucose	Lactose	Di động	Indole	Citrate	Urease	Methyl red	H <sub>2</sub> S
<i>Salmonella</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Shigella</i>	-	+	-	-	+/-	-	-	+	-

- Định danh kháng định bằng các kit: API 20E, VITEK, MALDI-TOF

- Lưu ý: MALDI-TOF không thể định danh *Shigella* sp. vì phổ protein của *Shigella* tương đồng với *E. coli*.

- Phân type huyết thanh của *Salmonella* sp. và *Shigella* sp. bằng các xét nghiệm ngưng kết huyết thanh học:

+ *Shigella* sp.: thử nghiệm ngưng kết với các loại kháng nguyên O:

- Ngưng kết với Antiserum A=*Shigella dysenteriae*
- Ngưng kết với Antiserum B=*Shigella flexneri*
- Ngưng kết với Antiserum C = *Shigella boydii*
- Ngưng kết với Antiserum D=*Shigella sonnei*

+ *Salmonella* sp.: Thử nghiệm ngưng kết với các loại kháng nguyên bề mặt O, H để định danh theo hệ thống phân loại Kauffman-White. Việc định danh này thường được thực hiện ở các phòng xét nghiệm tham chiếu.

*Định danh Vibrio cholerae:*

- Sau mỗi 24 giờ ủ, kiểm tra trên TCBS xem có khuẩn lạc (khóm) màu vàng mọc (vi khuẩn lên men sucrose). Đây là khuẩn lạc (khóm) nghi ngờ chi *Vibrio*, cần kiểm tra tính chất sinh hóa và định danh các vi khuẩn này.

- Cây chuyển môi trường alkaline pepton sau ủ 8-24 giờ ra đĩa TCBS, sau đó khi ủ TCBS 24 giờ, kiểm tra khuẩn lạc (khóm) có tính chất như trên.

**Bảng 2:** Một số tính chất sinh hóa của *Vibrio cholerae*

	Oxidase	Glucose	Lactose	Đi động	Indole	Citrate	Urease	Methyl red	H <sub>2</sub> S
<i>Vibrio cholerae</i>	+	+	-	+++	+	+	-	-	-

- Định danh khẳng định bằng API, VITEK, MALDI-TOF.

- Xác định serogroup *Vibrio cholera* bằng thử nghiệm ngưng kết tìm kháng nguyên O1, O139.

- Serogroup O1 có 2 biotype: Classic và El tor được phân biệt như sau:

<i>V. cholerae</i> O1	Hemolysin	VP	Polymixin B
Classic	-	-	S
El tor	+	+	R

Định danh *Aeromonas* và *Plesiomonas*:

- Kiểm tra môi trường Blood agar, MacConkey sau 24 giờ ủ để tìm khuẩn lạc (khóm) Gram âm có kích thước to, màu xám, lượng khuẩn lạc (khóm) loại này phải chiếm trên 70% tổng lượng khuẩn lạc (khóm) trên môi trường nuôi cấy.

- Thực hiện test oxidase cho các khuẩn lạc (khóm) này, nếu dương tính là nghi ngờ thuộc chi *Aeromonas* sp, hay *Plesiomonas* sp.

- Định danh khẳng định bằng API, VITEK hay MALDI-TOF.

- Định danh các *E. coli* gây bệnh tiêu chảy:

Vì khuẩn *E. coli* có một số loại gây bệnh tiêu chảy như Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) và enteroinvasive *E. coli* (EIEC). Các *E. coli* gây bệnh được định danh và phân loại dựa trên các yếu tố độc lực: Toxin, yếu tố bám dính và xâm lấn. Phương pháp xác định các yếu tố độc lực bao gồm nuôi cấy, miễn dịch, PCR được thực hiện ở các phòng xét nghiệm tham chiếu.

STEC serotype O157: H7 có thể gây ra bệnh cảnh tán huyết-ure huyết. Việc nuôi cấy vi khuẩn này cần môi trường chọn lọc (ví dụ như CHROMAGAR O157 hay CT-SMAC). Khi phát hiện khóm khuẩn nghi ngờ có thể làm ngưng kết latex với bộ ngưng kết latex *E. coli* O157. Định danh khẳng định cần phải gửi vi khuẩn đến phòng xét nghiệm tham chiếu để chẩn đoán bằng các phương pháp sinh học phân tử.

**Bảng 3:** Tính chất các khuẩn lạc (khóm) vi khuẩn gây bệnh trong phân trên các loại môi trường nuôi cấy

Loại môi trường	Khuẩn lạc (khóm) nghi ngờ	Tác nhân nghi ngờ	Xét nghiệm cần làm
MacConkey	Khuẩn lạc (khóm) không màu, tròn, trong suốt, có oxidase dương tính	<i>Vibrio cholerae</i>	Định danh Ngưng kết O1, O139
	Khuẩn lạc (khóm) không màu, tròn, bờ đều không lên men lactose, oxidase âm tính	<i>Shigella</i>	Định danh Ngưng kết định serogroup
	Khuẩn lạc (khóm) không màu, mịn, bờ răng cưa không lên men lactose oxidase âm tính	<i>Salmonella</i>	Định danh Ngưng kết định các serotype
Blood agar	Khuẩn lạc (khóm) đục, tròn Oxidase dương tính	<i>Plesiomonas</i> <i>Aeromonas</i>	Định danh
Salmonella-Shigella agar	Khuẩn lạc (khóm) trong, không màu	<i>Shigella</i> và một số <i>Salmonella</i>	Định danh, Ngưng kết xác định các serotype, serogroup
	Khuẩn lạc (khóm) trong, không màu, tâm đen	Một số loài <i>Salmonella</i> và <i>Proteus</i>	Định danh
XLD agar	Khuẩn lạc (khóm) đỏ, tâm đen	<i>Salmonella</i>	Định danh Ngưng kết định các serotype
	Khuẩn lạc (khóm) đỏ	<i>Shigella</i>	Định danh Ngưng kết định serogroup
MEA	Khuẩn lạc (khóm) trong, oxidase dương	<i>Vibrio</i>	Định danh
TCBS	Khuẩn lạc (khóm) vàng to oxidase dương	<i>Vibrio cholerae</i>	Định danh Ngưng kết serogroup O1, O139
	Khuẩn lạc (khóm) xanh lá cây Oxidase dương	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Định danh

*Kháng sinh đồ:*

Thực hiện kháng sinh đồ cho các loại vi khuẩn gây bệnh phân lập được trong phân và báo cáo kết quả kháng sinh đồ chung với kết quả định danh.

### **9. Diễn giải kết quả và báo cáo**

- Nếu không phát hiện vi khuẩn gây bệnh: trả kết quả “Không phân lập được vi khuẩn gây bệnh trong mẫu nuôi cấy”.

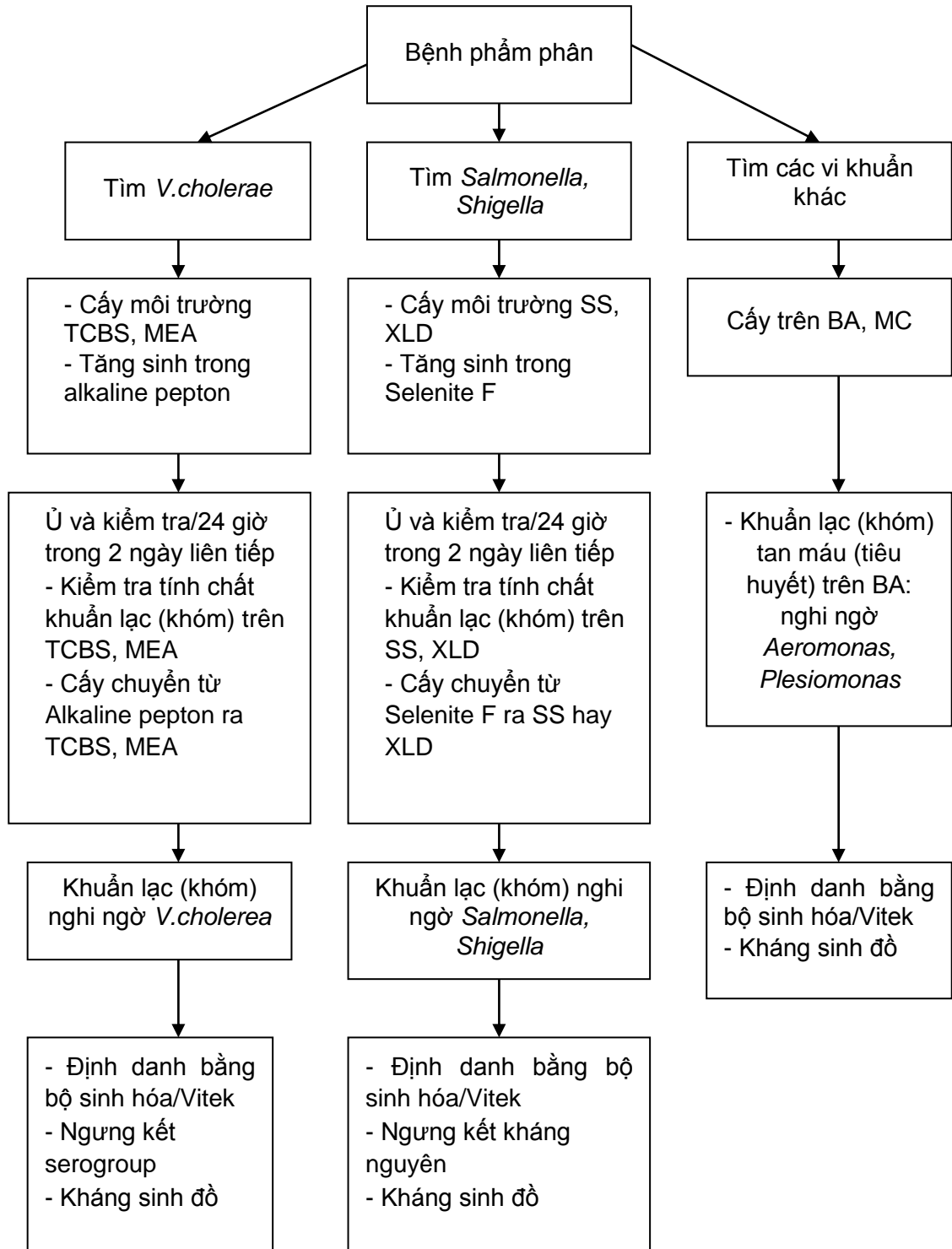
- Phát hiện vi khuẩn gây bệnh: trả kết quả “Phát hiện vi khuẩn “ tên vi khuẩn” trong mẫu nuôi cấy”, trả kháng sinh đồ kèm theo.

### **10. Lưu ý (cảnh báo)**

Khi nuôi cấy định danh được vi khuẩn tả *Vibrio cholerae* cần phải báo cáo với cấp trên vì thuộc danh sách các dịch bệnh cần thông báo.

### **11. Lưu trữ hồ sơ**

Lưu trữ theo quy định



**Sơ đồ quy trình cấy phân**

# QUY TRÌNH CẤY BỆNH PHẨM ĐƯỜNG SINH DỤC

## 1. Mục đích

Hướng dẫn quy trình kỹ thuật cách thực hiện nuôi cấy, định danh một số vi sinh vật thường gây nhiễm trùng đường sinh dục.

## 2. Phạm vi áp dụng

- Quy trình này áp dụng cho khoa/phòng xét nghiệm Vi sinh khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm sinh dục.

- Áp dụng cho các bệnh phẩm đường sinh dục được thu thập từ bệnh nhân nghi ngờ nhiễm khuẩn bệnh lây truyền bằng đường sinh dục (phụ nữ, nam giới) hay khi bị huyết trắng nghi do nhiễm khuẩn (phụ nữ).

## 3. Trách nhiệm

- Khoa lâm sàng thu thập mẫu bệnh phẩm đúng theo hướng dẫn và vận chuyển mẫu để có được bệnh phẩm tốt nhất cho nuôi cấy. Thông tin loại mẫu thu thập cần phải thể hiện trong phiếu xét nghiệm đi kèm để phòng xét nghiệm có căn cứ biện luận kết quả nuôi cấy.

- Phòng xét nghiệm có nhiệm vụ nhận, kiểm tra và tiến hành xét nghiệm mẫu theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Nhân viên xét nghiệm phải được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh và được phân công.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học và được phân công.

## 4. Nguyên lý

Sử dụng môi trường chuyên biệt và các môi trường thạch dinh dưỡng nhằm phát hiện lượng vi khuẩn hiện diện trong các bệnh phẩm đường sinh dục.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO<sub>2</sub> /hoặc thiết bị tạo CO<sub>2</sub>
- Máy ly tâm tế bào (nếu có)



## **b. Dụng cụ**

- Pipette vô trùng
- Que cấy 1  $\mu$ L
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

## **c. Vật liệu**

*Môi trường nuôi cấy:*

- BA (Blood Agar): Thạch máu
- MC (MacConkey): Thạch MacConkey
- CATM (Chocolate Thayer-Martin agar): Thạch Chocolate Thayer-Martin

*Hóa chất:*

Bộ thuốc nhuộm Gram

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

- Sử dụng chủng chuẩn *N. gonorrhoeae* ATCC 49226.

## **7. An toàn**

- An toàn sinh học cấp II.
- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý bệnh phẩm và thực hiện xét nghiệm.
- Tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **a. Chuẩn bị**

Lấy, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm.

*Lấy bệnh phẩm xét nghiệm nuôi cấy"*

*Ở nam giới:*

- Đẩy da qui đầu ra sau, dùng cồn 70% lau sạch da qui đầu, chờ khô.
- Bệnh nhân vuốt nhẹ dương vật dọc theo đường tiểu (niệu đạo) để ra cho được một giọt mủ và thấm giọt mủ lên một que tăm bông (que gòn) vô khuẩn, phần còn lại

phết trên một lam kính. Que tăm bông (que gòn) được cho vào môi trường vận chuyển Stuart hay Amies. Gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt.

- Nếu bệnh nhân không vượt được mủ ra, có thể dùng que tăm bông (que gòn) mảnh luồn vào bên trong ống niệu quản sâu khoảng 3-4 cm, xoay nhẹ và rút ra, cho ngay vào môi trường vận chuyển Stuart hay Amies, để ở nhiệt độ phòng <30°C trong vòng 12 giờ, không bảo quản mẫu trong tủ lạnh.

- Nếu chỉ cần cấy phân lập tìm *N. gonorrhoeae*, tốt nhất là cấy trên thạch phân lập CATM ngay sau khi lấy bệnh phẩm, cách lấy là dùng que cấy nhựa hay que cấy kim loại hoặc que tăm bông (que gòn) mảnh luồn vào bên trong ống niệu quản sâu khoảng 3-4 cm, xoay nhẹ và rút ra. Cấy ngay trên đĩa thạch CATM và gửi đến phòng xét nghiệm.

- Các loại bệnh phẩm khác có thể lấy để khảo sát là phết hậu môn, phết họng, phết mũi khi lấy nội soi trực tràng ở người đồng tính luyến ái.

#### *Ở nữ giới:*

- Bệnh nhân được nằm trên bàn khám phụ khoa, rửa sạch bộ phận sinh dục ngoài bằng nước, thấm khô, sau cho cho mỏ vịt vào. Mỏ vịt được tiệt trùng bằng hấp ướn hay sấy khô chứ không phải bằng hóa chất.

- Dùng tăm bông (que gòn) lấy huyết trắng ở thành sau của âm đạo để xét nghiệm trực tiếp tìm *T. vaginalis* và nấm. Tăm bông (que gòn) này được cho vào một lọ có dung dịch bảo quản rồi gửi ngay đến phòng xét nghiệm để soi tươi. Nếu muốn nuôi cấy tìm vi khuẩn hay nấm thì lấy huyết trắng phết bằng que tăm bông (que gòn), cấy ngay trên đĩa thạch CATM và gửi đến phòng xét nghiệm, hoặc đưa vào môi trường vận chuyển Stuart hay Amies, để ở nhiệt độ phòng < 30°C trong vòng 12 giờ, không bảo quản mẫu trong tủ lạnh.

- Đối với người bị nghi nhiễm lậu, lấy bệnh phẩm từ lòng cổ tử cung bằng cách dùng bông vô trùng lau sạch huyết trắng, sau đó dùng một tăm bông (que gòn) mảnh đưa vào lòng cổ tử cung xoay nhẹ trong 10 giây trước khi rút ra. Lấy mẫu bằng 2 que tăm bông (que gòn), một que phết lên một lam kính, que còn lại cho vào môi trường vận chuyển Stuart hay Amies, cấy ngay trên đĩa thạch CATM và gửi đến phòng xét nghiệm, hoặc đưa vào môi trường vận chuyển Stuart hay Amies, để ở nhiệt độ phòng < 30°C trong vòng 12 giờ, không bảo quản mẫu trong tủ lạnh.

#### *Ở trẻ em:*

- Dùng tăm bông (que gòn) vô khuẩn lấy mủ mắt nếu nghi bị viêm mủ kết mạc mắt do lậu.

- Dùng tăm bông (que gòn) vô khuẩn lấy mủ từ âm đạo của bé gái (trường hợp bị hẹp âm).

#### *Các trường hợp đặc biệt:*

- Tìm *Chlamydia trachomatis* bằng kỹ thuật nhuộm kháng thể huỳnh quang trực tiếp: lấy bệnh phẩm từ lòng cổ tử cung như trong trường hợp tìm vi khuẩn lậu. Phết tăm

bông (que gòn) này lên một lam kính lõ chuyên dùng, để khô tự nhiên rồi nhỏ lên một giọt acetone hay methanol, chờ khô. Bọc lam kính bằng một tờ giấy nhôm và gửi ngay đến phòng xét nghiệm. Trường hợp chưa gửi đến phòng xét nghiệm được, có thể bảo quản lam kính trong tủ lạnh 4°C trong tối đa không quá 1 tuần.

- Các vết loét: lau sạch bằng bông vô khuẩn, nặn chất dịch vào một tấm bông (que gòn) vô khuẩn, phần còn lại phết trên một lam kính. Que tấm bông (que gòn) được cho vào một ống nghiệm nắp chặt vô khuẩn hoặc vào môi trường vận chuyển Stuart hay Amies, gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt.

### **b. Vận chuyển và bảo quản mẫu**

- Mẫu dịch đường sinh dục cần được đưa xuống phòng xét nghiệm ngay để nuôi cấy.

- Nếu không thể vận chuyển được ngay đến phòng xét nghiệm thì vào môi trường vận chuyển Stuart hay Amies để ở nhiệt độ phòng < 30°C trong vòng 12 giờ, không bảo quản mẫu trong tủ lạnh.

- Có thể vận chuyển trong túi Bio Bag CO<sub>2</sub>

### **c. Tiêu chuẩn từ chối mẫu**

- Bệnh phẩm không có nhãn, phiếu chỉ định xét nghiệm không đầy đủ.

- Thiếu số lượng.

- Bệnh phẩm > 12 giờ (nếu bảo quản trong môi trường vận chuyển Stuart hay Amies).

### **d. Quy trình xử lý mẫu**

- Phòng vi sinh tiếp nhận và xử lý ngay các mẫu bệnh phẩm đường sinh dục.

- Quá trình xét nghiệm mẫu bệnh phẩm bao gồm các bước sau:

*Bước 1: Thực hiện soi trực tiếp, nhuộm Gram*

1. Bệnh phẩm lấy ở nam giới hay trẻ em

- Làm tiêu bản nhuộm Gram, quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại x100 (vật kính đầu): Nếu chỉ có 4-10 bạch cầu trong một vi trường và không có song cầu Gram (-) nội tế bào thì rất nhiều khả năng bệnh nhân bị viêm niệu đạo không phải do lậu.

- Nếu có trên > 10 bạch cầu trong một vi trường và/hay phát hiện có song cầu Gram (-) nội tế bào, có thể chắc trên 98% bệnh nhân bị lậu.

- Không làm tiêu bản nhuộm Gram với bệnh phẩm phết họng hay phết hậu môn.

- Tuy nhiên, nếu là phết mũi lấy từ nội soi trực tràng thì rất có giá trị để làm tiêu bản nhuộm Gram.

2. Bệnh phẩm lấy ở phụ nữ

- Làm tiêu bản soi tươi với vật kính x40, rất cần thiết để phát hiện *Trichomonas vaginalis* và nấm men.

- Làm tiêu bản nhuộm Gram các tấm bông (que gòn) lấy bệnh phẩm trên lam kính và quan sát dưới kính hiển vi x100, vật kính dầu.

+ Trường hợp bệnh phẩm lấy từ âm đạo:

- Nếu có ít < 5 bạch cầu trong một vi trường và có trực khuẩn Gram dương (thường là *Lactobacillus*), thì đây là một bệnh phẩm âm đạo bình thường.

- Nếu có ít < 5 bạch cầu trong một vi trường, không có các trực khuẩn Gram dương (*Lactobacillus*), có nhiều trực khuẩn Gram âm nhỏ quanh tế bào kèm các vi khuẩn khác như cầu trực khuẩn Gram âm, trực khuẩn Gram âm, trực khuẩn Gram âm cong, thì có nhiều khả năng bệnh nhân bị viêm âm đạo do *Gardnerella vaginalis*.

- (3) Nếu có > 10 bạch cầu trong một vi trường, có khả năng bệnh nhân bị nhiễm *C. trachomatis*. Với bệnh phẩm lấy từ cổ tử cung: Có phát hiện các song cầu Gram âm nội tế bào. Tuy nhiên kết quả nhuộm Gram không thể chắc bệnh nhân bị lậu.

+ Trường hợp bệnh phẩm là nước tiểu:

Lấy mẫu nước tiểu bằng phương pháp vô khuẩn như đã đề cập ở phần cấy nước tiểu nhưng không phải lấy giữa dòng mà tốt nhất là lấy đầu dòng hay cuối dòng. Nước tiểu gửi đến phòng xét nghiệm phải được tiến hành xét nghiệm ngay bằng cách ly tâm ở tốc độ cao nhất của máy ly tâm bàn, sau đó chỉ lấy cặn để vừa làm tiêu bản nhuộm Gram, vừa cấy trên môi trường phân lập. Nếu quan sát nhuộm Gram có song cầu Gram âm đặc trưng và nội tế bào, có thể trả lời kết quả sơ bộ cho bác sĩ là nghi ngờ lậu cầu.

+ Trường hợp vết loét sinh dục:

- Soi tươi dưới kính hiển vi nền đen hay đảo phase tìm xoắn khuẩn giang mai.

- Trường hợp tìm *C. trachomatis*

- Nhuộm kháng thể huỳnh quang và đọc dưới kính hiển vi huỳnh quang.

*Bước 2: Nuôi cấy phân lập*

- Nuôi cấy phân lập vi khuẩn *N. gonorrhoeae* (vi khuẩn lậu):

- Cấy trên thạch Chocolate Thayer Martin (CATM), là thạch chocolate có bổ sung thêm 4 loại kháng sinh để ức chế các vi khuẩn thông thường mọc (vancomycin: 3mg/ml, colistin: 7.5mg/ml, nystatin: 12.5 IU/ml, trimethoprim lactate: 5mg/ml), thêm thạch BANg (có thể thay bằng BA nếu không có BANg) và MC hay Uriselect cho các vi khuẩn dễ mọc khác.

- Có thể cấy thêm trên thạch chocolate nếu nghi nhiễm khuẩn khó mọc khác.

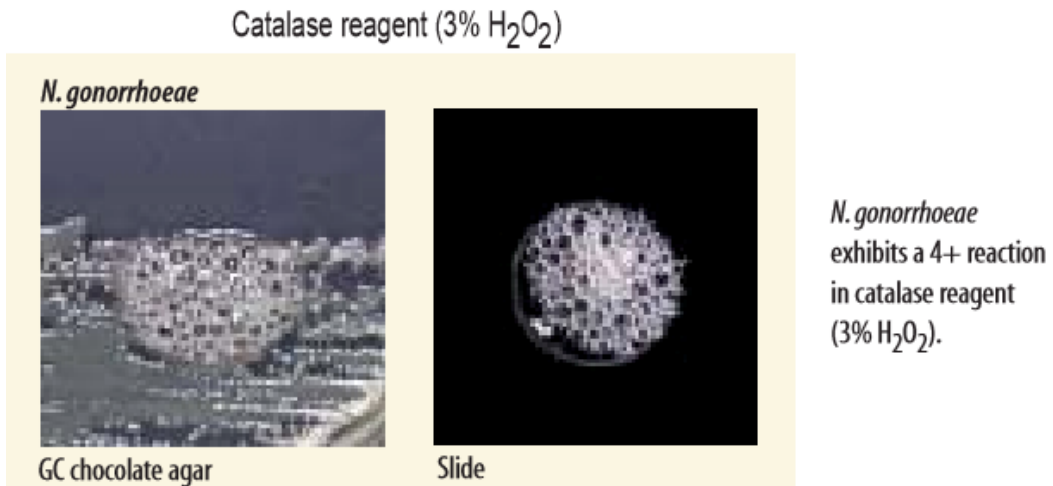
- Có thể cấy thêm thạch Sabouraud hoặc Chrome agar nếu có yêu cầu tìm nấm men.

- Các hộp BA và CA phải được ủ ở nhiệt độ 35-37°C /CO<sub>2</sub>. Các trường hợp khác, ủ khí trường bình thường. Theo dõi liên tục trong 3 ngày. Trường hợp cấy vi khuẩn *N. gonorrhoeae*, chỉ mở bình sau 48 giờ ủ.

- Oxidase test



- Catalase test



- Nếu có vi khuẩn thuộc nhóm gây bệnh mọc, tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ.

*Bước 3: Định danh và thực hiện kháng sinh đồ với các chủng nuôi cấy có vi khuẩn*

- Định danh vi khuẩn: Các bộ kit định danh thủ công (ví dụ như API), định danh tự động (VITEK, Pheonix...; MALDI-TOF...).

- Kháng sinh đồ: Kỹ thuật khuếch tán, tự động (VITEK, Pheonix...)

**Chú ý:** Không thực hiện kháng sinh đồ thường quy, thực hiện kháng sinh đồ khi điều trị thất bại. Điều trị kháng sinh theo hướng dẫn CLSI.

Các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm đường sinh dục:

- *N. gonorrhoeae*

- *Treponema pallidum* (soi tươi)
- *Chlamydia trachomatis*
- *Gardnerella vaginalis* (nhộm Gram)
- *Candida albicans* (nhộm Gram)
- *Trichomonas vaginalis* (soi tươi)
- Trực khuẩn Gram [-] (nhộm Gram)
- *Herpes simplex*

## 9. Báo cáo kết quả

- Trả kết quả nhuộm Gram càng sớm càng tốt, thường là trong vòng 1 tiếng sau khi nhận bệnh phẩm. Sự có mặt của bất kỳ loại vi khuẩn nào đều có ý nghĩa sơ bộ.
- Trả kết quả nuôi cấy sau khi định danh và thực hiện kháng sinh đồ.

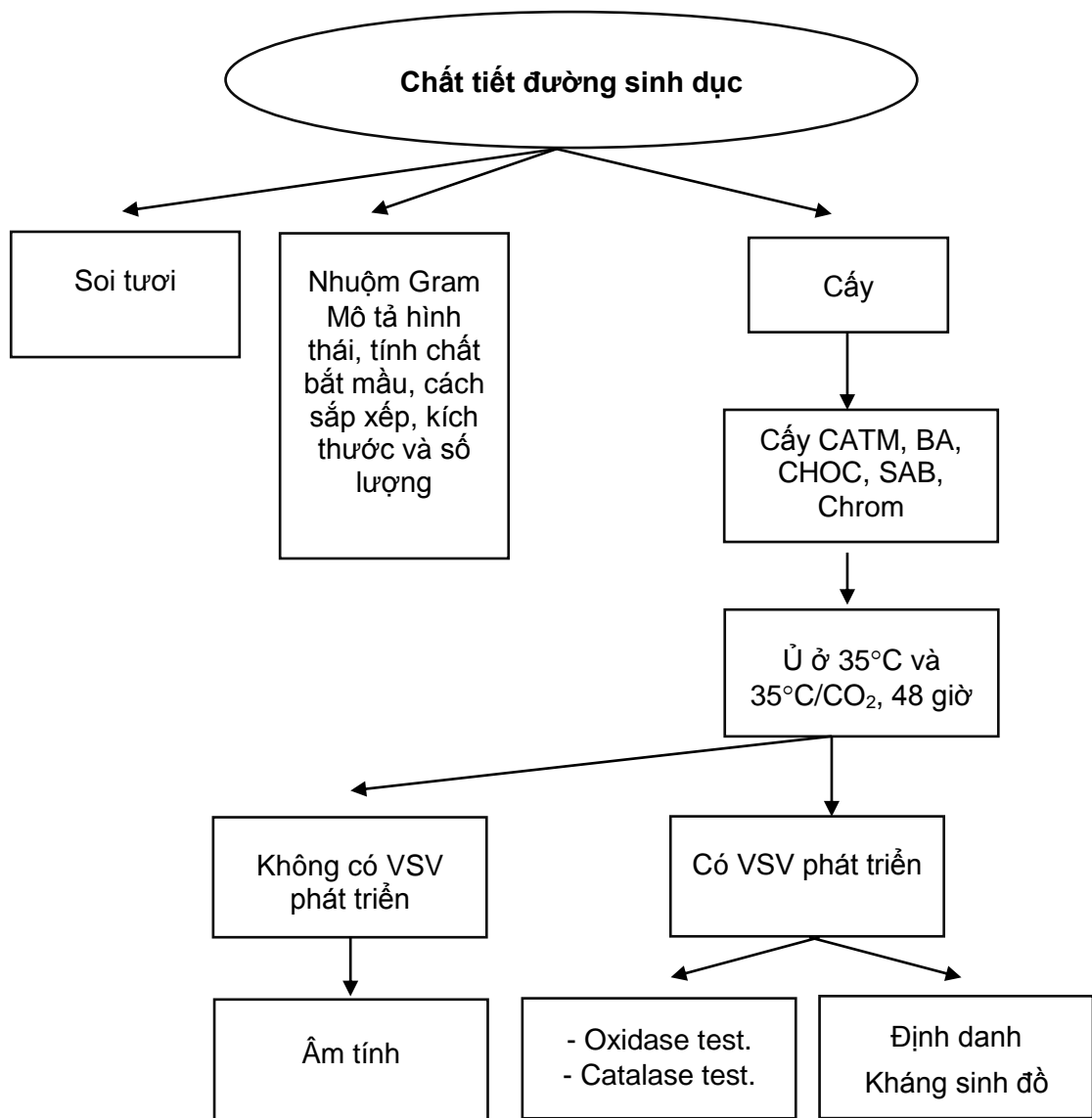
## 10. Lưu ý

- Kết quả có thể âm tính giả do cách thu thập và vận chuyển mẫu
- Môi trường và thiết bị nuôi cấy không đủ

### Kỹ thuật khác

Có thể chẩn đoán nhiễm khuẩn đường sinh dục các loại bằng kỹ thuật nhuộm huỳnh quang, TPHA, ELISA, ECL, PCR (đặc biệt kỹ thuật PCR chẩn đoán lậu cầu)

## 11. Lưu trữ hồ sơ: Theo quy định



**Sơ đồ nuôi cấy bệnh phẩm chất tiết đường sinh dục**





# Chương III

## KỸ THUẬT ĐỊNH DANH VI KHUẨN TỪ BỆNH PHẨM LÂM SÀNG

### ĐỊNH DANH CÁC CẦU KHUẨN GRAM DƯƠNG

#### 1. Mục đích

Mục đích của quy trình này hướng dẫn phương pháp phát hiện và định danh một số loại cầu khuẩn Gram dương gây bệnh thường gặp. Các sơ đồ, hình ảnh và bảng được thiết kế trong quy trình giúp nhân viên phòng xét nghiệm dễ dàng xác định tác nhân gây bệnh bằng cách thực hiện các thử nghiệm, xét nghiệm định danh theo từng bước. Tuy nhiên quy trình này không thể bao quát định danh tất cả các loại cầu khuẩn Gram dương, đặc biệt các cầu khuẩn thuộc họ *Streptococcus sp.*

#### 2. Phạm vi áp dụng

- Quy trình này áp dụng cho Khoa/Phòng/Bộ phận xét nghiệm Vi sinh khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp.

- Định danh cầu khuẩn Gram dương gây bệnh thường gặp ở Vi sinh lâm sàng bao gồm: tụ cầu *Staphylococcus sp.*, liên cầu *Streptococcus sp.*, cầu khuẩn đường ruột *Enterococcus sp.* và một số cầu khuẩn Gram dương khác.

#### 3. Trách nhiệm

- Phòng xét nghiệm vi sinh có nhiệm vụ nuôi cấy, phân lập thực hiện các test định danh vi khuẩn theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Nhân viên thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh Y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Nhân viên xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

#### 4. Nguyên tắc

Trên tiêu bản nhuộm Gram, cầu khuẩn Gram dương bắt màu tím đậm và có các hình thái sắp xếp đa dạng: đứng thành chùm, đứng thành chuỗi, đứng riêng, đôi... Dựa vào tính chất này mà chúng ta có thể tiến hành các bước định danh tiếp theo dựa trên các xét nghiệm sinh hóa, định danh...

**Chú ý:** Vì hình dạng khuẩn lạc (khóm) của cầu khuẩn Gram dương rất đa dạng, nhuộm Gram là một bước bắt buộc để tiến hành định danh cho nhóm vi khuẩn này.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO<sub>2</sub>/hoặc thiết bị tạo CO<sub>2</sub>

### b. Dụng cụ

- Pipette vô trùng
- Que cấy 1  $\mu$ L
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

### c. Vật liệu

*Môi trường nuôi cấy:*

- Blood agar (BA)
- Chocolate agar (CA)
- Một số các môi trường chọn lọc khác dành cho vi khuẩn Gram dương (nếu có)

*Hóa chất:*

- Catalase (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Urea test, Hippurate test
- Đĩa giấy kháng sinh polymyxin B (300U), novobiocin (5g), bacitracin (0.4U), vancomycin, optochin
- Bộ *Streptococcus* grouping antisera
- Các bộ kit định danh thủ công (ví dụ như API Strep...), kit định danh tự động (ví dụ card định danh vi khuẩn Gram dương của VITEK II, Pheonix; hóa chất định danh của kỹ thuật MALDI-TOF...)

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

- Các chủng vi khuẩn chuẩn ATCC họ Gram dương.

## 7. An toàn

Áp dụng tiêu chuẩn an toàn sinh học cấp II

## 8. Nội dung thực hiện

**a. Bước 1:** Quan sát hình dạng khóm khuẩn mọc trên BA hay CA

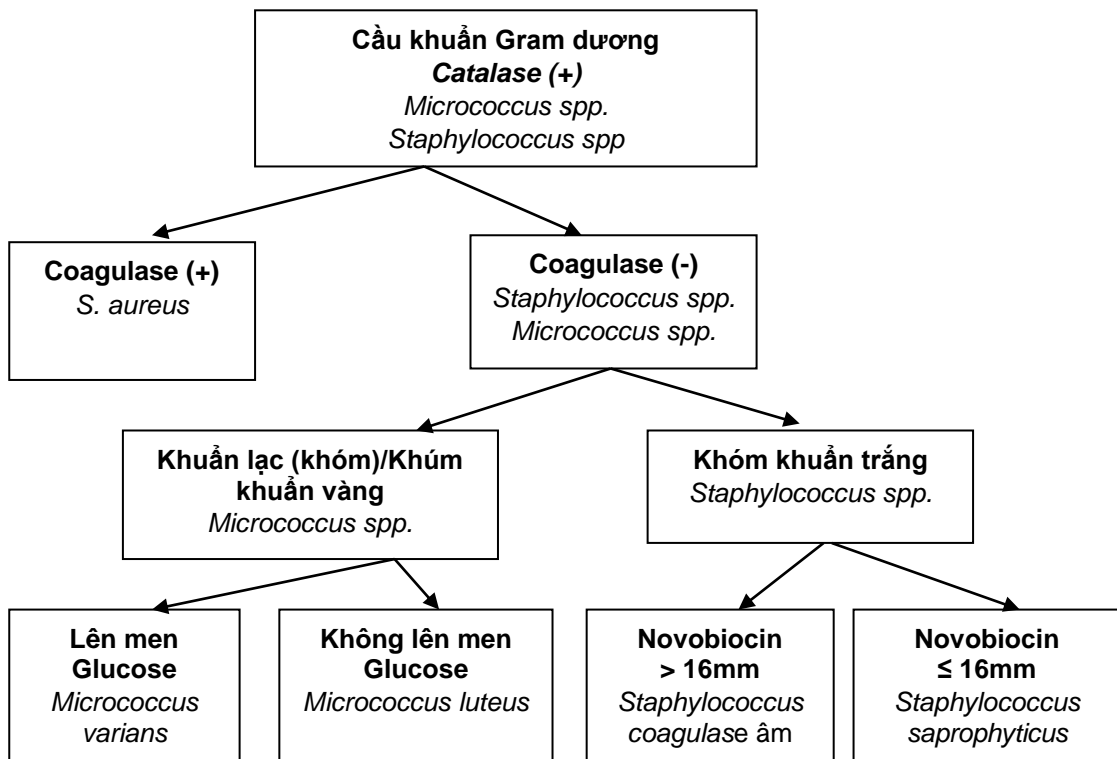
**b. Bước 2:** Tiến hành thử nghiệm catalase và nhuộm Gram khóm khuẩn.

- Hầu hết vi khuẩn Gram dương thuộc chi *Staphylococcus spp.* và *Micrococcus spp.* đều cho kết quả catalase dương tính và có dạng hình cầu, đứng thành chùm bất màu tím đậm trên tiêu bản nhuộm Gram.

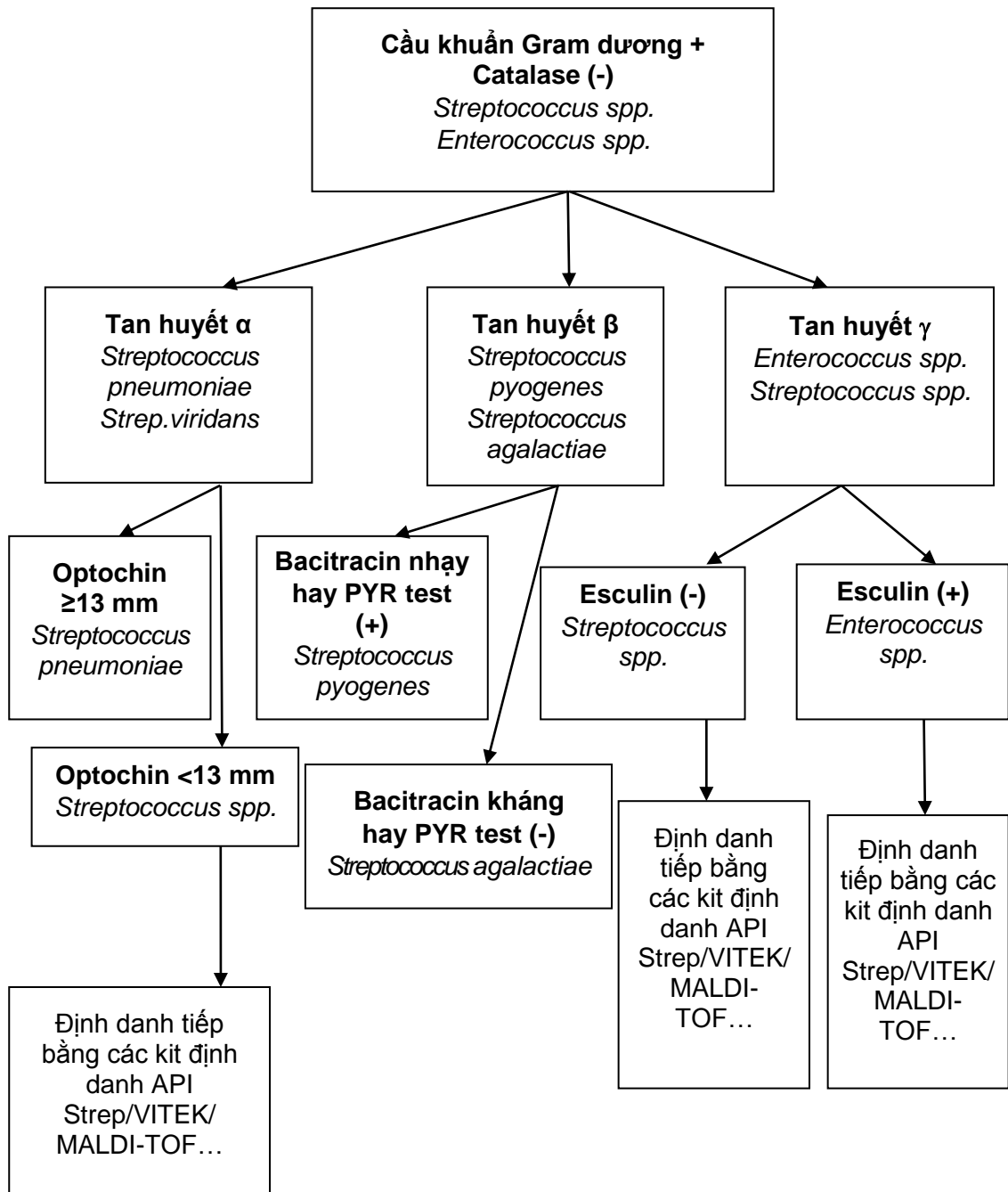
- Tất cả cầu khuẩn Gram dương thuộc chi *Streptococcus spp.* và *Enterococcus spp.* đều cho kết quả catalase âm tính và có dạng hình cầu, đứng đôi, chuỗi bất màu tím đậm trên tiêu bản nhuộm Gram.

**c. Bước 3:** Định danh cầu khuẩn Gram dương

Có nhiều cách tiến hành định danh vi khuẩn là các cầu khuẩn Gram dương. Tài liệu này trình bày cách định danh thường được sử dụng dựa trên các thử nghiệm đơn giản, sẵn có trong phòng xét nghiệm vi sinh.



**Sơ đồ 1:** Sơ đồ định danh cầu khuẩn gram dương có catalase dương



**Sơ đồ 2:** Sơ đồ định danh cầu khuẩn Gram dương có catalase âm

#### **d. Các phương pháp định danh khác**

Định danh vi khuẩn thuộc chi *Streptococcus*: Các phương pháp định danh cổ điển hay tự động đều không thể định danh tất cả các loại vi khuẩn thuộc chi *Streptococcus*. Trên thực hành vi sinh lâm sàng thường định danh các vi khuẩn *Streptococcus* gây bệnh thường gặp như *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*.... Ngoài phương pháp định danh theo sơ đồ 2, một số vi khuẩn thuộc họ *Streptococcus* có thể định danh bằng phương pháp xác định nhóm A, B, C, F, G.

- Xác định nhóm A, B, C, F, G của nhóm vi khuẩn *Streptococcus* bằng phương pháp ngưng kết latex hay coagglutination:

- Nhóm A: *Streptococcus pyogenes*, một số liên cầu thuộc nhóm *Streptococcus milleri* ...
- Nhóm B: *Streptococcus agalactiae*
- Nhóm C: *Streptococcus anginosus*, một số liên cầu thuộc nhóm *Streptococcus milleri*
- Nhóm F: một số liên cầu thuộc nhóm *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus milleri*
- Nhóm G: một số liên cầu thuộc nhóm *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus milleri*

Định danh *Enterococcus* spp.

- Vì *Enterococcus faecium* thường có tỷ lệ đề kháng cao với các kháng sinh (đặc biệt là Vancomycin), phòng xét nghiệm cần sử dụng các bộ kit định danh để định danh phân biệt *Enterococcus faecalis* và *Enterococcus faecium* trong nhóm *Enterococcus* spp.

- Các kit định danh thường sử dụng là: API Strep, VITEK ID card, MALDI-TOF...

#### **9. Diễn giải kết quả và báo cáo**

Báo cáo kết quả định danh và thực hiện kháng sinh đồ phù hợp với vi khuẩn.

**10. Lưu ý (cảnh báo):** Không có

**11. Lưu trữ hồ sơ:** Lưu trữ theo quy định

# ĐỊNH DANH CÁC CẦU KHUẨN GRAM ÂM

## 1. Mục đích

Mô tả và hướng dẫn cách thực hiện các thử nghiệm định danh cầu khuẩn Gram âm thường gặp: Não mô cầu (*Neisseria meningitides*) trong dịch não tủy, máu. Lậu cầu (*Neisseria gonorrhoeae*) trong đường sinh dục, đôi khi ở họng, kết mạc mắt trẻ sơ sinh.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này áp dụng cho khoa/phòng xét nghiệm Vi sinh khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong các bệnh phẩm nuôi cấy.

## 3. Trách nhiệm

- Phòng xét nghiệm Vi sinh có nhiệm vụ nuôi cấy, thực hiện các test định danh vi khuẩn theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Sử dụng các thử nghiệm Oxydase, Catalase, ONPG và một số phương tiện khác để định danh các loại cầu khuẩn Gram âm phân lập được.

## 5. Thiết bị và vật tư

- Môi trường thạch chocolat hoặc thạch máu 5%
- Canh thang tăng sinh (TSI hoặc BHI có 5% Fildes enrichment)
- Dung dịch catalase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3%
- Đĩa giấy ONPG và Oxidase
- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Thử nghiệm các loại đường Maltose, Glucose (hay Dextrose) và Sucrose
- Bộ kháng huyết thanh A, B, C, Y, W135 (nếu có điều kiện)
- + Tủ ấm thường và bình kín đốt nền/Bình có túi Gaspak hoặc tủ ấm CO<sub>2</sub>, bộ dụng cụ cấy.
- + Máy định danh vi khuẩn VITEK2 (nếu có điều kiện)

- + Que cấy có vòng ăng to (10 $\mu$ l) và nhỏ (1 $\mu$ l).
- + Đèn cồn.
- + Các loại ống nghiệm thủy tinh và nhựa (bảo quản mẫu).
- + Pipet chính xác và đầu tip các loại 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l.
- + Lam kính và lá kính phủ (lamen).
- + Máy ly tâm.
- + Máy trộn, lắc.
- + Kính hiển vi quang học.

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Kiểm tra chất lượng các môi trường nuôi cấy vi khuẩn theo quy định.
- Kiểm tra chất lượng định kỳ các thử nghiệm Oxydase, Catalase, ONPG.
- Kiểm tra chất lượng định kỳ tủ ấm CO<sub>2</sub>, hệ thống máy VITEK2.
- Các chủng chuẩn ATCC (*American Type Culture Collection*) gồm có: *Neisseria gonorrhoeae* ATCC ® 19424<sup>TM</sup> và *Neisseria meningitidis* ATCC ® 13077<sup>TM</sup>

## 7. An toàn

- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình về an toàn xét nghiệm.
- Các thao tác kỹ thuật phải nhẹ nhàng tránh tạo hạt mù khi mở nắp lọ bệnh phẩm, lấy mẫu bệnh phẩm.

## 8. Nội dung thực hiện

### a. Các thử nghiệm xác định Não mô cầu, Lậu cầu

- Thử nghiệm oxidase: Làm ướt thanh giấy lọc đã được sấy vô khuẩn từ trước bởi dung dịch oxidase (tetramethyl-p-phenylenediamine hydrochloride), lấy ăng cây nhựa gạt một khuẩn lạc (khóm) nghi ngờ và quệt lên thanh giấy đã tẩm dung dịch oxidase, nếu vùng giấy được quệt vi khuẩn chuyển màu tím (đỏ tím) được đọc là Dương tính (vi khuẩn có cytochrome oxidase - là một thành phần trong chuỗi hô hấp của vi khuẩn).
- Thử nghiệm oxy hóa đường: Glucose, Maltose, Sucrose
- Thử nghiệm Catalase: Dùng đầu pipette thủy tinh hoặc tăm tre vô khuẩn, lấy 1 -2 khúm vi khuẩn/khuẩn lạc (khóm) đặt lên lam kính. Nhỏ dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% lên khúm vi khuẩn. Đọc kết quả: Sau khi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiếp xúc với khúm vi khuẩn, nếu có hiện tượng sủi bọt xảy ra lập tức: Catalase (+), nếu không có hiện tượng sủi bọt xảy ra: Catalase (-).

- Thử nghiệm ONPG: Cho 1 ml nước cất vô trùng vào ống nghiệm. Lấy một khuyên khuẩn lạc (khóm) chuyển vào ống nghiệm chứa nước cất. Cho vào ống 1 đĩa giấy ONPG. Đặt ống nghiệm vào tủ ấm 37°C trong 24 giờ. Đọc kết quả sau 4 giờ ủ:

+ **Phản ứng dương tính:** dung dịch trong ống có màu vàng (thường phản ứng dương sau 4 giờ, một số vi khuẩn có thể cho phản ứng nhanh sau 15-30 phút). Nếu dung dịch chưa có thay đổi màu sắc, đọc lại kết quả sau 24 giờ ủ.

+ **Phản ứng âm tính** (sau 24 giờ ủ): dung dịch không màu.

### **b. Tiêu chuẩn xác định các cầu khuẩn Gram âm**

- Đặc điểm khuẩn lạc (khóm): Tròn vòng nhẹ, xám nhạt nhưng không có mùi đặc biệt, không gây tan huyết môi trường nuôi cấy.

- Hình thể vi khuẩn: Song cầu hình hạt cà phê xếp úp mặt vào nhau, bắt màu Gram âm.

- Thử nghiệm Oxidase (+)

- Thử nghiệm Catalase (-)

- Thử nghiệm ONPG (-)

- Thử nghiệm phản ứng sinh hóa các loại đường:

+ Glucose (+), Maltose ( $\pm$ ), Sucrose (-)

- Dựa vào thử nghiệm các loại đường để định danh các cầu khuẩn Gram âm:

Tên vi khuẩn	Glucose	Maltose	Sucrose
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	-
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-

### **c. Xác định typ huyết thanh (nếu có điều kiện)**

Tùy theo cấu trúc kháng nguyên vỏ hay protein màng ngoài, não mô cầu có 13 typ huyết thanh. Typ huyết thanh được xác định bằng phản ứng ngưng kết trên phiến kính với kháng huyết thanh đặc hiệu, chú ý các typ A, B, C, Y, W135

### **d. Định danh bằng máy VITEK2 (Nếu có điều kiện).**

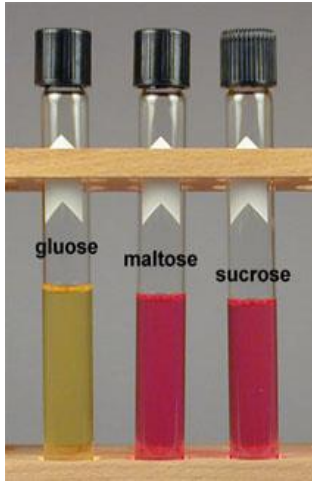
## **9. Diễn giải và báo cáo kết quả**

Tùy theo kết quả định danh, có thể báo cáo một trong các kết quả sau:

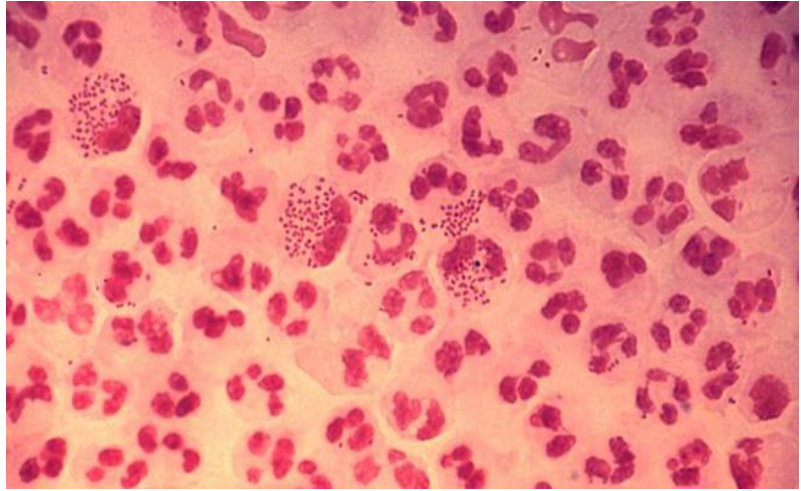
- *Neisseria meningitidis*.

- *Neisseria gonorrhoeae*.





Kết quả các loại đường  
của Lậu cầu



Hình ảnh nhuộm Gram của Lậu cầu

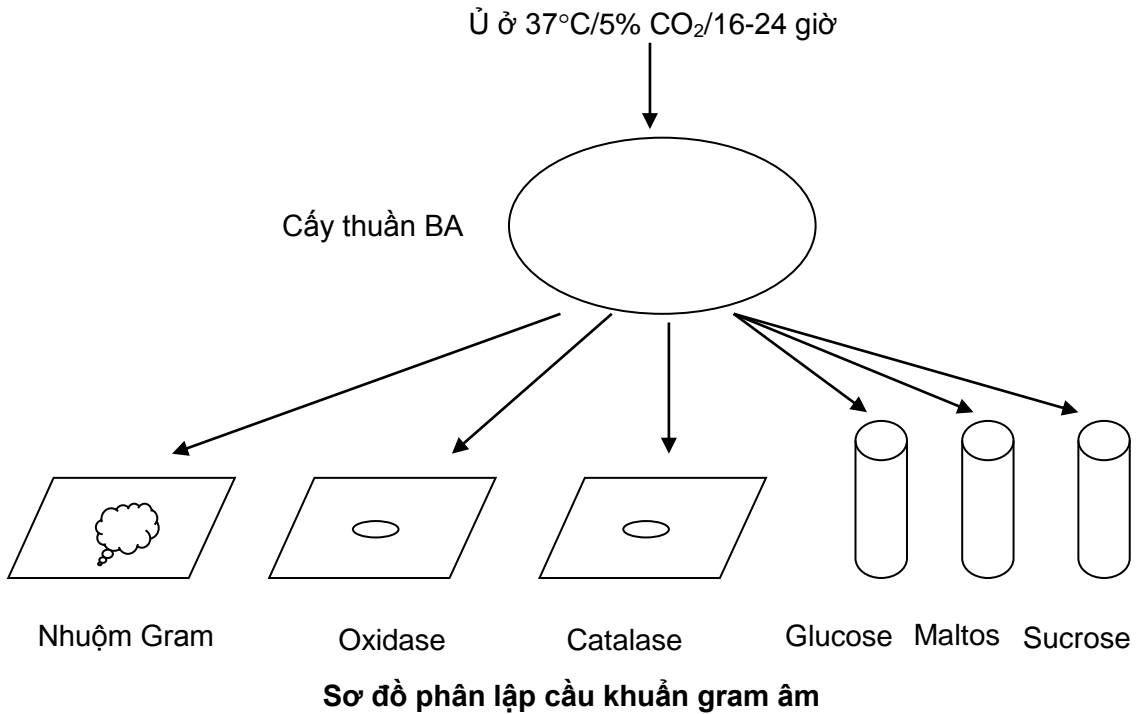
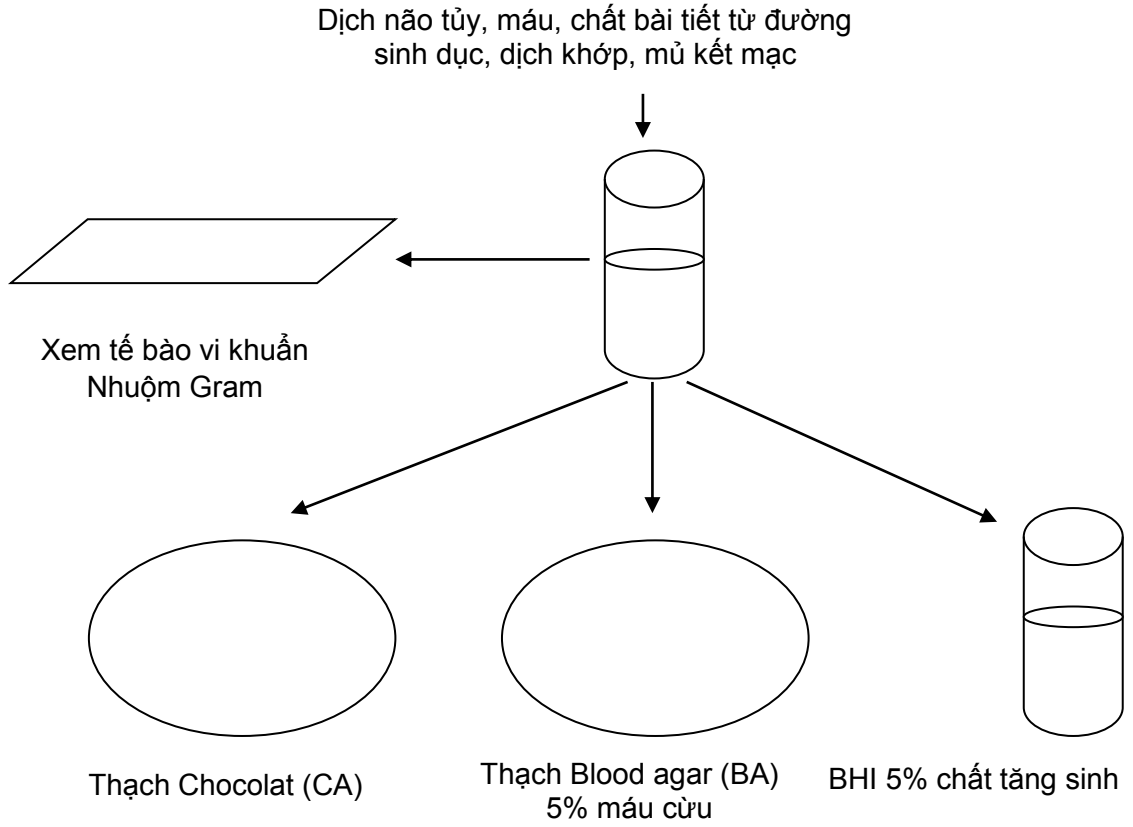
## 10. Lưu ý (cảnh báo)

Những sai lệch có thể xảy ra:

- Thử nghiệm Oxidase âm tính giả, dẫn đến bỏ sót các vi khuẩn *Neisseria*.
- Ở một số trường hợp, vi khuẩn *Neisseria meningitidis* có khả năng kháng lại chất tẩy màu và vì thế xuất hiện ở màu tím hồng rất đậm gần giống như Gram dương.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

Ghi sổ trả kết quả, vào các biểu mẫu liên quan đến quy trình và lưu trữ hồ sơ.



# **ĐỊNH DANH CÁC TRỰC KHUẨN HỌ *ENTEROBACTERIACEAE***

## **1. Mục đích**

- Mục đích của quy trình này hướng dẫn phương pháp phát hiện và định danh một số loại trực khuẩn Gram âm thuộc họ vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae*. Đây là họ vi khuẩn Gram âm gây bệnh thường gặp nhất tại phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

- Các sơ đồ hình ảnh và bảng được thiết kế trong quy trình giúp nhân viên phòng xét nghiệm Vi sinh dễ dàng xác định tác nhân gây bệnh bằng cách thực hiện các thử nghiệm, xét nghiệm định danh theo từng bước.

## **2. Phạm vi áp dụng**

Quy trình này áp dụng cho Khoa/Phòng/Bộ phận xét nghiệm Vi sinh khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp tại phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng bao gồm: *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, ...

## **3. Trách nhiệm**

- Phòng xét nghiệm có nhiệm vụ nuôi cấy, thực hiện các test định danh vi khuẩn theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## **4. Nguyên tắc**

Vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* rất đa dạng. Việc định danh và xếp vào nhóm này dựa vào các tính chất sinh hóa và đặc điểm kháng nguyên (antigen). Đặc điểm chung của nhóm vi khuẩn này là vi khuẩn hình que, bắt màu Gram âm, một số vi khuẩn có tính di động, hầu hết mọc tốt ở 37°C. Đây là họ vi khuẩn kỵ khí tùy nghi, oxidase âm tính, catalase dương tính. Một số các vi khuẩn thuộc họ này có thể định danh dựa trên các tính chất sinh hóa. Một số vi khuẩn (*Salmonella*) lại cần phải định danh dựa vào tính chất sinh hóa và phản ứng ngưng kết antisera đa giá. Vì tính đa dạng của họ vi khuẩn này nên tài liệu chỉ hướng dẫn định danh một số vi khuẩn thường gặp và có tầm quan trọng gây bệnh trên lâm sàng.

## **5. Trang thiết bị và vật tư**

### **a. Trang thiết bị**

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học

- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO<sub>2</sub>

### **b. Dụng cụ**

- Pipette vô trùng
- Que cấy 1 μL
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

### **c. Vật liệu**

*Môi trường nuôi cấy:*

- Blood agar
- MacConkey agar
- Một số các môi trường chọn lọc khác dành cho vi khuẩn Gram âm đường ruột (nếu có): CLED agar, DCA, XLD, SS, ....

*Hóa chất:*

- Catalase (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Oxidase test, Urea test, Methyl red, Citrat, Môi trường di động, Indole, VP, Ornithine decarboxylase, Lysine decarboxylase.
- Các bộ ngưng kết serogroup, antigen của các vi khuẩn gây bệnh đường ruột (*Salmonella*, *Shigella*).
- Các bộ kit định danh thủ công (ví dụ như API Strep...), kit định danh tự động (ví dụ card định danh vi khuẩn Gram dương của VITEK, Pheonix; hóa chất định danh của kĩ thuật MALDI-TOF...)

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.
- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.
- Các chủng chuẩn ATCC họ *Enterobacteriaceae*.

## **7. An toàn:** Áp dụng tiêu chuẩn an toàn sinh học cấp II

## **8. Nội dung thực hiện**

**a. Bước 1:** Quan sát hình dạng khuẩn lạc (khóm)/khúm khuẩn trên BA và MC và các môi trường thạch khác.

- BA: khuẩn lạc (khóm) có đường kính 2-3 mm, tròn, xám, mượt hay nhầy, có thể có tan máu (tiêu huyết) và mọc lan ra xung quanh (*Proteus spp.*)

- MC: khuẩn lạc (khóm) có màu hồng (lên men lactose) hay không màu (không lên men lactose), hình dạng và kích thước thay đổi theo từng loài vi khuẩn nên không đặc trưng.

- CLED: khuẩn lạc (khóm) có màu hồng (lên men lactose) hay màu xanh (không lên men lactose), hình dạng và kích thước thay đổi theo từng loài vi khuẩn nên không đặc trưng.

- XLD: *Salmonella* sp. là khuẩn lạc (khóm) đỏ, tâm đen; *Shigella* spp. là khuẩn lạc (khóm) đỏ.

- SS: *Salmonella* spp. là khúm trong, không màu, tâm đen; *Shigella* spp. là khúm trong, không màu.

- CIN: chỉ mọc trực trùng Gram âm, khuẩn lạc (khóm) có màu đỏ đậm ở trung tâm (lên men mannitol), viền ngoài khuẩn lạc (khóm) trong suốt.

**c. Bước 2:** Tiến hành thử nghiệm oxidase trên các khúm khuẩn này.

Tất cả vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* đều cho phản ứng oxidase âm tính ngoại trừ *Plesiomonas shigellois*. Đây là bước thử nghiệm quan trọng không thể bỏ qua trong quy trình định danh.

**d. Bước 3:** Định danh vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae*

- Có nhiều cách tiến hành định danh vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae*. Các phương pháp phổ biến hiện nay bao gồm:

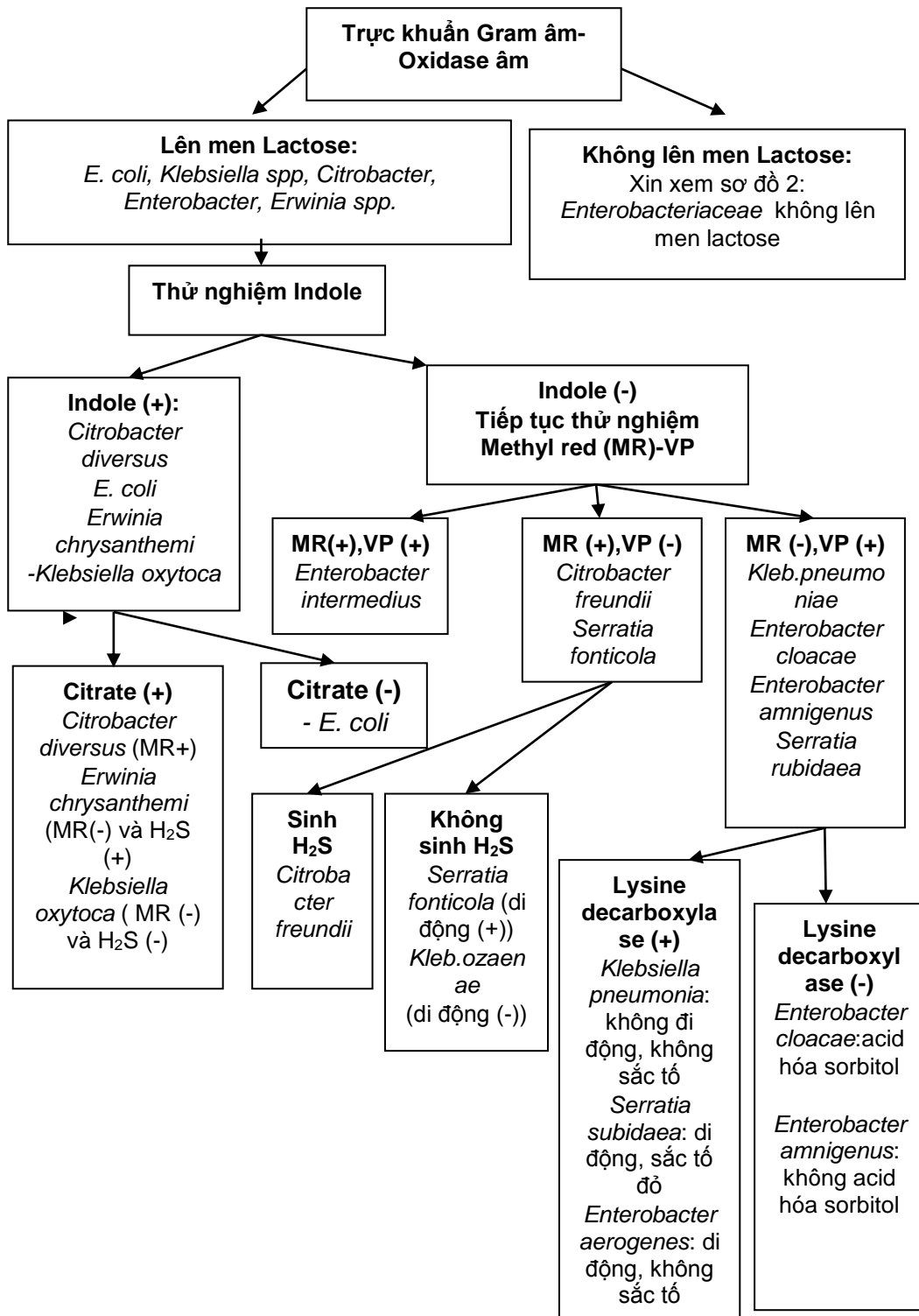
- Định danh dựa trên các phản ứng sinh hóa của vi khuẩn (Sơ đồ 1 và Sơ đồ 2)

- Định danh dựa vào các bộ kit sinh hóa thủ công (ví dụ API 20E), kit sinh hóa tự động (VITEK, Phoenix): phòng xét nghiệm cần thực hiện theo đúng quy trình hướng dẫn của bộ kit để có thể có kết quả định danh chính xác nhất.

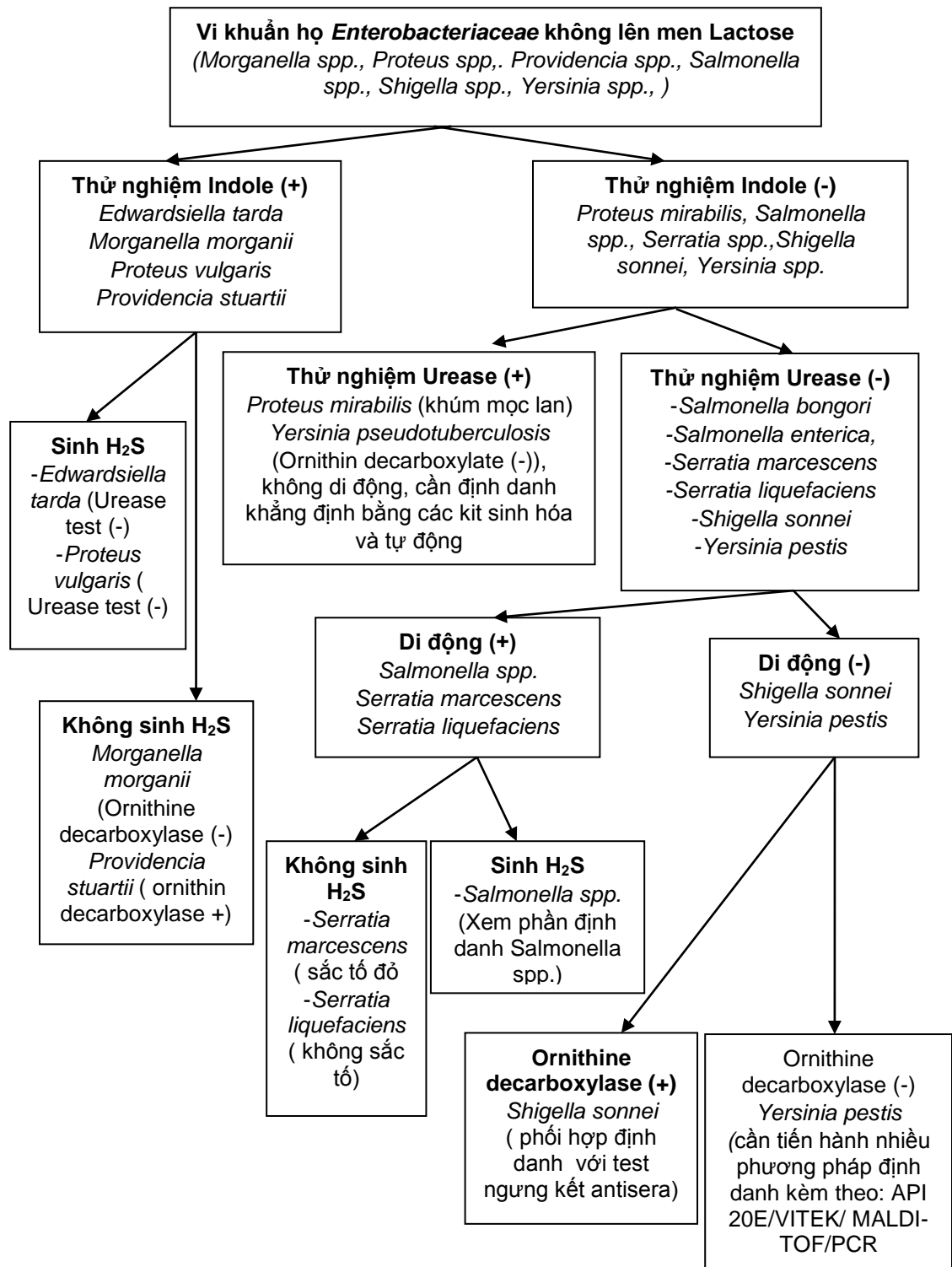
- Định danh dựa vào các phản ứng ngưng kết kháng nguyên, định type huyết thanh (*Salmonella*, *Shigella*) (Xin xem quy trình Nuôi cấy phân).

- Định danh dựa vào phổ protein của vi khuẩn (MALDI-TOF: Matrix-assited laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry): Đây là phương pháp phân tích thành phần protein của tế bào vi khuẩn, so sánh cấu trúc thành phần này với ngân hàng dữ liệu chuẩn, từ đó ra kết quả tên vi khuẩn một cách khá chính xác. Ưu điểm của phương pháp này là cho kết quả nhanh trong vòng một giờ. Lưu ý phương pháp này không thể phân biệt *E. coli* và *Shigella* spp. do phổ protein tương tự nhau).

- Định danh dựa vào các phản ứng sinh học phân tử PCR 16S.



**Sơ đồ 1:** Sơ đồ định danh vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* lên men lactose bằng các tính chất sinh hóa thông thường



**Sơ đồ 2:** Sơ đồ định danh vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* không lên men Lactose bằng các tính chất sinh hóa thông thường

## 9. Diễn giải kết quả và báo cáo

Báo cáo kết quả định danh và thực hiện kháng sinh đồ phù hợp với vi khuẩn.

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

- Vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* rất đa dạng và có tính chất sinh hóa tương tự nhau. Vì vậy, việc định danh vi khuẩn thuộc họ này thường phải kết hợp nhiều phương pháp định danh để có kết quả tin cậy.

- Cần phải kết hợp nhiều phương pháp chẩn đoán và đối chiếu với bệnh cảnh lâm sàng khi định danh ra vi khuẩn *Yersinia pestis*. Nếu đã khẳng định chẩn đoán cần phải tiến hành báo cáo với cấp trên vì đây là vi khuẩn trong danh sách báo dịch.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

Lưu trữ theo quy định



# ĐỊNH DANH CÁC TRỤC KHUẨN NON-ENTEROBACTERIACEAE

## 1. Mục đích

- Mục đích của quy trình này hướng dẫn phương pháp phát hiện và định danh một số loại trực khuẩn Gram âm không thuộc họ vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae*. Nhóm vi khuẩn này bao gồm *Pseudomonas* spp. và các vi khuẩn Gram âm không lên men lactose. Nhóm vi khuẩn này có nguồn gốc từ môi trường bên ngoài hay môi trường bệnh viện. Đây cũng là tác nhân gây bệnh cảnh nhiễm trùng trên các cơ địa suy giảm miễn dịch, cơ thể người bệnh có mảnh ghép plastic, nhiễm trùng bệnh viện.

- Tài liệu này cung cấp thông tin về các môi trường nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn, đặc điểm hình thái học và các phản ứng sinh vật hóa học đặc trưng của một số vi khuẩn gây bệnh quan trọng. Các sơ đồ hình ảnh và bảng được thiết kế trong quy trình giúp nhân viên phòng xét nghiệm dễ dàng xác định tác nhân gây bệnh bằng cách thực hiện các thử nghiệm, xét nghiệm định danh theo từng bước. Hiện nay, các phòng xét nghiệm được trang bị hệ thống định danh tự động (VITEK, Phoenix, MALDI-TOF...) hay bộ sinh hóa định danh thương mại (ví dụ: API 20NE) giúp việc định danh các vi khuẩn này dễ dàng, chính xác và nhanh chóng hơn.

## 2. Phạm vi áp dụng

- Quy trình này áp dụng cho khoa/phòng xét nghiệm Vi sinh khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp.

- Định danh các trực khuẩn Gram âm không thuộc họ *Enterobacteriaceae*, không lên men lactose gây bệnh thường gặp ở lâm sàng bao gồm: họ vi khuẩn *Pseudomonas* spp., họ vi khuẩn *Aeromonas* spp., họ *Vibrio* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp. .

## 3. Trách nhiệm

- Phòng xét nghiệm có nhiệm vụ nuôi cấy, thực hiện các test định danh vi khuẩn theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Đặc điểm chung của nhóm vi khuẩn này vi khuẩn hình que, bắt màu Gram âm, hiếu khí và không có bào tử. Một số vi khuẩn trong nhóm này có thể oxy hóa glucose và cho phản ứng catalase dương tính.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO<sub>2</sub>/hoặc thiết bị tạo CO<sub>2</sub>

### b. Dụng cụ

- Pipette vô trùng
- Que cấy 1 µL
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

### c. Vật liệu

Môi trường nuôi cấy:

- Blood agar
- MacConkey agar
- Một số môi trường chọn lọc khác dành cho vi khuẩn Gram âm (nếu có):

+ Môi trường chọn lọc cho *Burkholderia cepacia* complex: *Burkholderia cepacia* selective agar (BCSA), *Burkholderia cepacia* agar (BCA), Oxidation-fermentation Polymyxin Bacitracin Lactose agar (OFPBL) (nếu có).

+ Môi trường chọn lọc cho *Vibrio cholerae*: Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar (TCBS).

Hóa chất:

- Catalase (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Oxidase test, Glucose, Lactose, H<sub>2</sub>S
- Urea test, môi trường di động, VP
- Các bộ ngưng kết huyết thanh đa giá *Vibrio cholerae* O1, O139, đơn giá Ogawa, Inaba.
- Các bộ kit định danh thủ công (ví dụ như API 20NE...), kit định danh tự động (ví dụ card định danh vi khuẩn Gram dương của VITEK, Pheonix; hóa chất định danh của kỹ thuật MALDI-TOF...).

## 6. Kiểm tra chất lượng

- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được kiểm tra để đảm bảo không bị nhiễm bẩn.

- Các chủng vi khuẩn chuẩn non-*Enterobacteriaceae*.

## 7. An toàn

Áp dụng tiêu chuẩn an toàn sinh học cấp II.

## 8. Nội dung thực hiện

### a. Quy trình định danh

**Bước 1:** Quan sát hình dạng khuẩn khuẩn trên các môi trường nuôi cấy và hình thái vi khuẩn trên lame nhuộm Gram

**Bảng:** Hình dạng khuẩn lạc (khóm) trên các môi trường nuôi cấy và hình thái trên tiêu bản nhuộm Gram

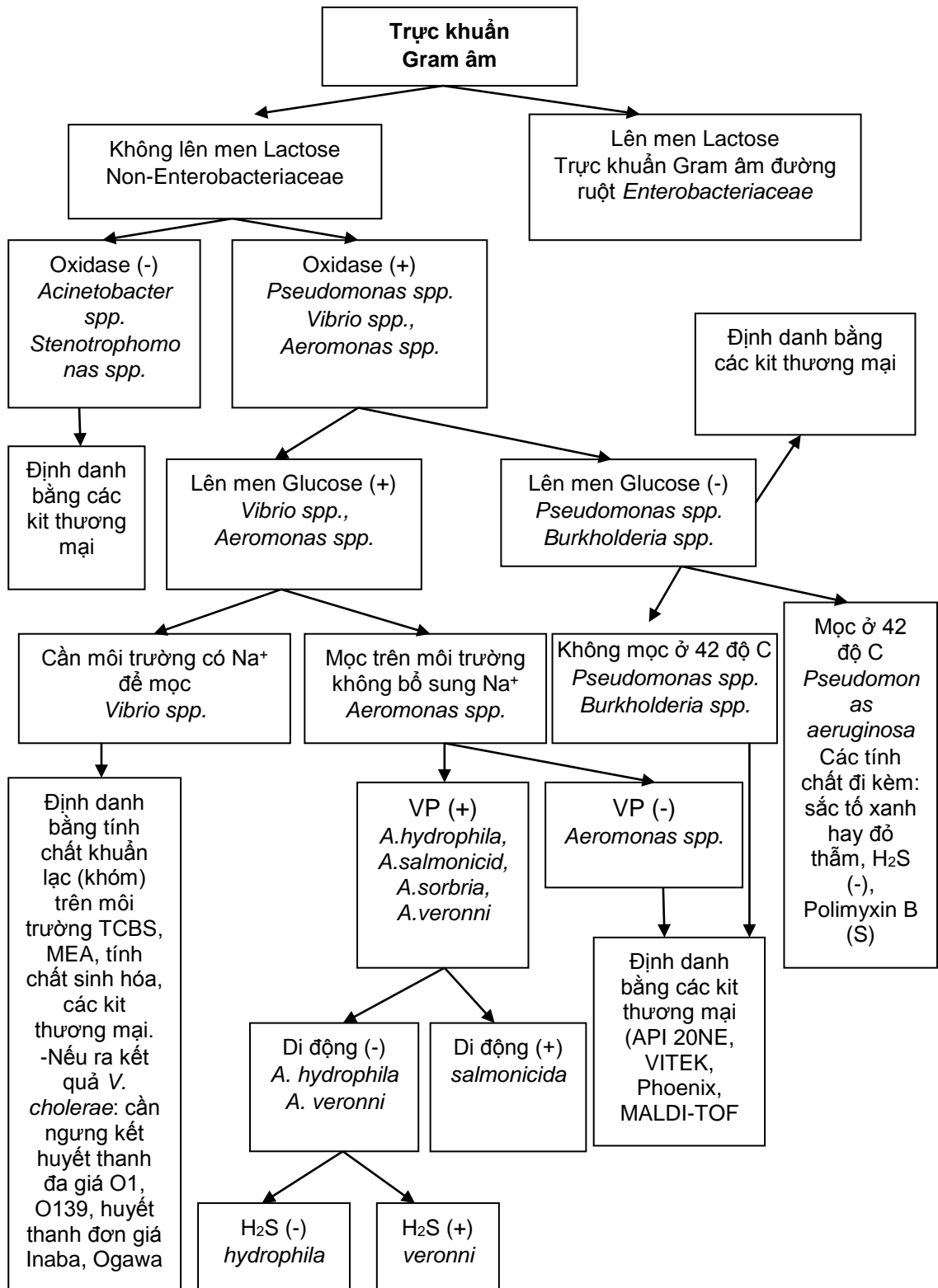
Vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc (khóm) trên đĩa thạch sau ủ ở 35-37°C/16-18 giờ	Hình thái/nhuộm Gram
<i>P. aeruginosa</i>	Khuẩn lạc (khóm) bề mặt phẳng, rìa không đều, có màu xanh kim loại, xanh dương hay không màu, một số loại mọc khúm nhầy, có mùi nhỏ	Trực khuẩn Gram âm dạng thẳng, dài, hoặc hơi cong
<i>P. putida</i> và <i>P. fluorescens</i>	Không có hình dạng khuẩn lạc (khóm) và mùi đặc trưng	Như trên
<i>P. stutzeri</i>	Khuẩn lạc (khóm) khô, nhăn nheo, bám dính vào môi trường thạch,	Như trên
<i>P. mendocina</i>	Khuẩn lạc (khóm) mượt, bề mặt láng phẳng, có sắc tố vàng nâu.	Như trên
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	Khuẩn lạc (khóm) tròn, đường kính 1-2mm, một số loại có khuẩn lạc (khóm) ánh màu kim loại	Trực khuẩn Gram âm, mảnh, bắt màu đậm ở 2 cực (hình kim băng)
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Khuẩn lạc (khóm) có thể khô như <i>P. stutzeri</i> hay nhầy bóng, óng ánh như màu ngọc trai	Trực khuẩn Gram âm hay xếp tụ thành đám dày. Khi nhuộm Gram từ bệnh phẩm, vi khuẩn bắt màu không đều, có thể thấy dạng bắt màu đậm ở 2 cực
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	BA: Khuẩn lạc (khóm) có màu vàng hay xanh lá cây	Trực khuẩn Gram âm thẳng hay dạng thẳng, hơi cong

Vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc (khóm) trên đĩa thạch sau ủ ở 35-37°C/16-18 giờ	Hình thái/nhuộm Gram
<i>Acinetobacter spp.</i>	Khuẩn lạc (khóm) thường mượt, nhầy, màu nhạt, xám	Trực khuẩn Gram âm ngắn, thường có 2 dạng trực khuẩn và cầu trực khuẩn. Trên lame nhuộm có thể thấy cả dạng song cầu Gram âm
<i>Vibrio spp.</i>	BA: khuẩn lạc (khóm) tròn, 2-3mm đường kính, có tan máu (tiêu huyết) TCBS: khúm tròn, vàng (một số loài <i>Vibrio</i> có màu xanh), đường kính 2 mm	Trực khuẩn Gram âm mảnh, cong, hình dấu phẩy đặc trưng
<i>Aeromonas spp.</i>	BA: Khúm tròn, to, đầy đặn, có thể có tan máu (tiêu huyết), đường kính 1-3 mm. Khuẩn lạc (khóm) đổi màu xám và xanh đen sau 3 ngày. MC: Khuẩn lạc (khóm) nhạt màu do không lên men lactose. CIN: Khuẩn lạc (khóm) có màu hồng tâm đen, hình “mắt bò” đặc trưng do lên men mannitol	Trực khuẩn Gram âm dạng thẳng dài hay dạng cầu trực khuẩn, đầu tịt tròn, thường đứng đơn, cặp hay nối thành chuỗi

**Bước 2:** Phân biệt nhóm vi khuẩn này với họ *Enterobacteriaceae* bằng các thử nghiệm lên men lactose. Nhóm vi khuẩn này không lên men lactose, họ *Enterobacteriaceae* lên men lactose.

**Bước 3:** Thực hiện các phản ứng Oxidase và lên men Glucose để phân nhóm *Pseudomonas*, *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas spp.* Đây là bước thử nghiệm quan trọng nên không được bỏ qua.

**Bước 4:** Thực hiện các bước định danh theo hướng dẫn ở Sơ đồ 1



### **Lưu ý:**

Định danh *Burkholderia pseudomallei*:

- Đây là vi khuẩn gây bệnh được xếp vào nhóm An toàn sinh học cấp 3. Vi khuẩn gây bệnh cánh Meliodosis trên lâm sàng, đây là bệnh cánh nhiễm trùng nặng, có thể gây tử vong.

- Đặc tính vi khuẩn: trực khuẩn Gram âm, bắt màu đậm 2 cực, di động.

- Đặc tính sinh hóa: oxidase dương, nitrate (+), ONPG (-)

- Đặc tính kháng sinh: vi khuẩn kháng với polymyxin và aminoglycosides, nhạy với amoxicillin-clavulanate, trimethoprim/sulfamethoxazole, doxycillin, ceftazidim, imipenem.

- Định danh vi khuẩn này thường yêu cầu thực hiện trên các kit định danh (API 20NE, VITEK, PHOENIX, MALDI-TOF...)

### **b. Các phương pháp định danh**

Có nhiều cách tiến hành định danh vi khuẩn thuộc nhóm Non- *Enterobacteriaceae*. Các phương pháp phổ biến hiện nay bao gồm:

- Định danh dựa trên các phản ứng sinh hóa của vi khuẩn (Sơ đồ 1)

- Định danh dựa vào các bộ kit sinh hóa thủ công (ví dụ API 20NE), kit sinh hóa tự động (VITEK, Phoenix): phòng xét nghiệm cần thực hiện theo đúng quy trình hướng dẫn của bộ kit để có thể có kết quả định danh chính xác nhất.

- Định danh dựa vào các phản ứng ngưng kết huyết thanh đa giá, đơn giá cho *Vibrio cholerae* (Xem thêm quy trình nuôi cấy phân).

- Định danh dựa vào phổ protein của vi khuẩn (MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry): Đây là phương pháp phân tích thành phần protein của tế bào vi khuẩn, so sánh cấu trúc thành phần này với ngân hàng dữ liệu chuẩn, từ đó ra kết quả tên vi khuẩn một cách khá chính xác. Ưu điểm của phương pháp này là cho kết quả nhanh trong vòng một giờ.

- Định danh dựa vào các phản ứng sinh học phân tử (PCR 16S).

## **9. Diễn giải kết quả và báo cáo**

Báo cáo kết quả định danh và thực hiện kháng sinh đồ phù hợp với vi khuẩn.

## **10. Lưu ý (cảnh báo)**

- Nhóm vi khuẩn *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Acinetobacter* spp. rất đa dạng. Hướng dẫn trong quy trình chỉ là một trong nhiều cách để định danh nhóm vi khuẩn này. Việc định danh vi khuẩn thuộc nhóm này thường phải kết hợp nhiều phương pháp định danh để có kết quả tin cậy.

- Tài liệu này không đề cập định danh *Haemophilus* spp., nội dung này đề cập trong bài “ Định danh vi khuẩn *Haemophilus influenzae*”.

## **11. Lưu trữ hồ sơ**

Lưu trữ theo quy định.

# ĐỊNH DANH VI KHUẨN HAEMOPHILUS INFLUENZAE

## 1. Mục đích

Mô tả và hướng dẫn cách thực hiện các thử nghiệm định danh vi khuẩn *Haemophilus influenzae* và một số *Haemophilus* khác.

## 2. Phạm vi áp dụng

- Quy trình này áp dụng cho Khoa/Phòng/Bộ phận xét nghiệm Vi sinh khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp.

- Định danh vi khuẩn *Haemophilus influenzae* và một số *Haemophilus* khác trong các mẫu bệnh phẩm.

## 3. Trách nhiệm

- Phòng xét nghiệm có nhiệm vụ nuôi cấy, thực hiện các test định danh vi khuẩn theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Người thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Người nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Sử dụng các thử nghiệm yếu tố X, V, XV, các phản ứng sinh hóa (ODC, URE và IND) và các phương tiện khác để định danh, định typ vi khuẩn *Haemophilus* phân lập được.

## 5. Thiết bị và vật tư

- Môi trường và sinh phẩm cho nuôi cấy phân lập: Thạch chocolat, thạch máu, thạch Trypticase soy. Canh thang giàu dinh dưỡng. Iso VitaleX. Khoanh giấy X, V, XV. Khoanh giấy Cefinase. Nước muối sinh lý (NaCl 0,85%). Dung dịch Acetein (N-acetyl-L-cystine). Bộ nhuộm Gram. Cồn 70°.

- Dụng cụ và trang thiết bị cho nuôi cấy phân lập:

+ Que cấy dung tích 1μl và 10μl.

+ Các loại ống nghiệm thủy tinh 15 - 20 ml.

+ Ống nghiệm nhựa (cryotube và eppendorf bảo quản mẫu và ly tâm).

+ Giá để ống nghiệm.

- + Ống hút nhựa 1 ml (có quả bóp) dùng một lần.
- + Lam kính và lamén.
- + Đèn cồn.
- + Kính hiển vi.
- + Máy Vortex.
- + Máy ly tâm thường (4000 - 10.000 vòng).
- + Tủ ấm CO<sub>2</sub> hoặc tủ ấm thường + bình kín (để đốt được nến).

## **6. Kiểm tra chất lượng**

- Kiểm tra chất lượng các môi trường nuôi cấy vi khuẩn theo quy định.
- Kiểm tra chất lượng định kỳ các yếu tố X, V, XV, các phản ứng sinh hóa (ODC, URE và IND), thử nghiệm Cefinase.
- Kiểm tra chất lượng định kỳ máy ly tâm, tủ ấm CO<sub>2</sub>.

## **7. An toàn**

- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình về an toàn xét nghiệm.
- Các thao tác kỹ thuật phải nhẹ nhàng tránh tạo hạt mù khi mở nắp lọ bệnh phẩm, lấy mẫu bệnh phẩm.

## **8. Nội dung thực hiện**

### **8.1. Kỹ thuật lấy bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển về phòng thí nghiệm**

#### **8.1.1. Các loại bệnh phẩm**

- Bệnh phẩm đường hô hấp: Đờm (đàm), dịch hút tỵ hầu, dịch hút nội khí quản, tăm bông (que gòn) ngoáy tỵ hầu, tăm bông (que gòn) ngoáy họng.
- Bệnh phẩm từ tổ chức bị bệnh: Dịch não tủy, máu.

#### **8.1.2. Cách lấy bệnh phẩm**

- Chất dịch đường hô hấp: Lấy chất dịch đường hô hấp trong những trường hợp viêm phổi, viêm phế quản, viêm phế quản phổi... đờm (đàm), dịch tỵ hầu.
- Dịch não tủy: Lấy dịch não tủy trong trường hợp nghi viêm màng não.
- Máu: Lấy máu trong trường hợp bệnh nhân sốt cao, nghi nhiễm khuẩn huyết hoặc nghi viêm màng não, viêm phổi cấp.
- Các bệnh phẩm khác: Mủ amidan, mủ tai giữa, dịch chọc phổi.



## 8.2. Kỹ thuật xét nghiệm phân lập vi khuẩn *H. influenzae*

### 8.2.1. Xét nghiệm trực tiếp: Nhuộm Gram

- Tạo tiêu bản bệnh phẩm, nhuộm Gram để quan sát hình thể và đánh giá số lượng các tế bào viêm (bạch cầu đa nhân trung tính, đại thực bào) và vi khuẩn ở bên trong và ngoài tế bào theo (+); (++); (+++); (++++). Lưu ý, quan sát trực tiếp được làm trước khi xử lý bệnh phẩm cho nuôi cấy phân lập.

- Chú ý:

+ Nếu là đờm (đàm), dàn tiêu bản trước khi xử lý làm lỏng đờm (đàm), trên tiêu bản nhuộm Gram bệnh phẩm đường hô hấp, nếu trên 25 bạch cầu đa nhân và dưới 25 tế bào biểu mô (trên tổng số 100 tế bào ở vi trường) có khả năng do nhiễm khuẩn, và có thể thấy vi khuẩn *H. influenzae* ở cạnh hay bên trong bạch cầu.

+ Nếu là dịch não tủy: Sau khi ly tâm 2000 vòng/20 phút, hút dịch nổi sang một ống nghiệm khác (không bỏ đi), để lại 100 $\mu$ l “cặn”, lấy một giọt “cặn” dịch não tủy này nhỏ lên lam kính sạch, không dàn mỏng, để khô tự nhiên, cố định bằng nhiệt rồi nhuộm Gram. Nếu dịch não tủy quá ít, không cần ly tâm, lấy một giọt nhuộm Gram, phần còn lại để nuôi cấy hoặc làm các xét nghiệm phát hiện khác (PCR).

- Dưới kính hiển vi, quan sát tế bào bạch cầu đa nhân trung tính, hình thể vi khuẩn với những tính chất đặc thù... Hình ảnh *H. influenzae*: là những tế bào mảnh nhỏ, đa hình thể, bắt màu Gram âm.

8.2.2. Nuôi cấy và phân lập: Tùy theo từng loại bệnh phẩm để có các cách xử lý và nuôi cấy phù hợp:

#### a. Bệnh phẩm đường hô hấp

- Nếu bệnh phẩm đặc cần làm lỏng đờm (đàm) hoặc dịch đường hô hấp dung dịch Acetein (N-acetyl-L-cysteine) ở tỷ lệ đờm (đàm)/dung dịch = 5/1 và dùng máy khuấy Vortex làm lỏng đờm (đàm) trước khi nuôi cấy. Sau đó, nên pha loãng tiếp bệnh phẩm ít nhất 10 lần trong nước muối sinh lý trước khi nuôi cấy. Hiệu quả nhất trong phân lập vi khuẩn gây bệnh đường hô hấp nếu ta sử dụng phương pháp cấy đếm đối với các mẫu bệnh phẩm đường hô hấp để phát hiện và phân biệt các vi khuẩn gây bệnh nói chung và *H. influenzae* nói riêng ở các thành phần vi khuẩn chí ở đường hô hấp.

- Với *H. influenzae*, sau khi pha loãng bậc 10 với nước muối sinh lý (5 đến 6 ống), tiến hành cấy chia vùng (cấy đếm) trên môi trường thạch sôcôla và khẳng định tác nhân gây bệnh là *H. influenzae* dựa trên số lượng cấy đếm (số vi khuẩn có trong 01ml bệnh phẩm sẽ tăng lên rất đáng kể khi nó là tác nhân gây nhiễm trùng).

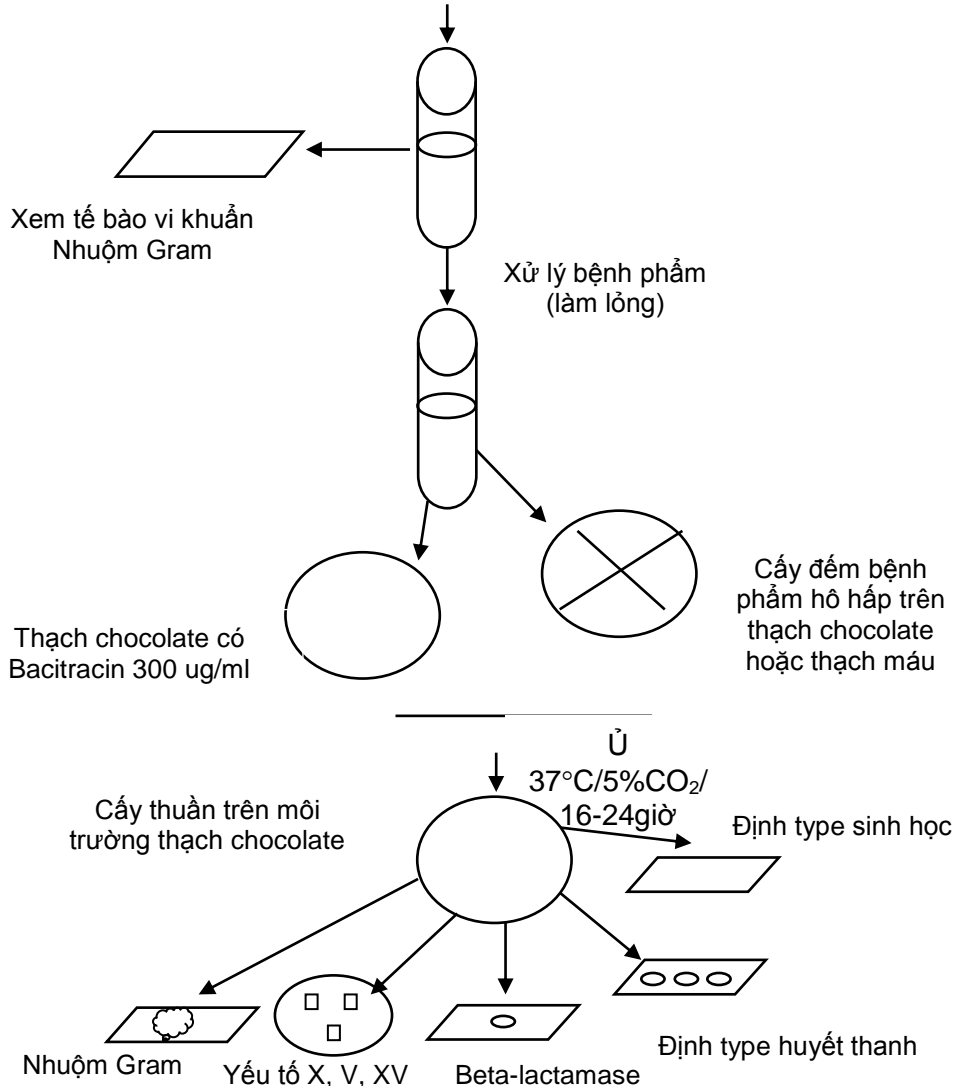
**b. Dịch não tủy:** Cấy song song vừa lên môi trường thạch sôcôla vừa cấy vào canh thang tăng sinh cho *H. influenzae* để nếu vi khuẩn không mọc trên môi trường thạch sẽ cấy chuyển tiếp từ canh thang tăng sinh sang thạch sôcôla vào các ngày 2,3.

**c. Dịch đường hô hấp (đờm (đàm), tã bông (que gòn) ngoáy họng).**

#### d. Bệnh phẩm máu

- Được cấy trong canh thang BHI có yếu tố phát triển theo dõi hàng ngày nếu dương tính sẽ được cấy chuyển ra môi trường thạch sôcôla để xác định tiếp.

- Các đĩa môi trường nuôi cấy tìm *H. influenzae* được ủ ấm trong khí trường 35-37°C có 5% CO<sub>2</sub> từ 16 - 24 giờ. Nếu không có tủ ấm CO<sub>2</sub>, đặt các hộp lồng vào chuông thủy tinh kín và đốt 1 ngọn nến, sau đó đặt chuông vào tủ ấm 37°C.



**Hình 1:** Sơ đồ phân lập *H. Influenzae*

- Sau 16-24 giờ, quan sát thấy các khuẩn lạc (khóm) của *H. influenzae* (trên môi trường thạch sôcôla khuẩn lạc (khóm) nhỏ vòng nhẹ, màu xám nhạt, bóng ướt nếu có vôi; trên môi trường thạch máu 7%, khuẩn lạc (khóm) nhỏ vòng nhẹ, hơi trong, óng ánh khi chiếu sáng, không gây tan huyết), có mùi đặc trưng. Cấy thuần lại trên một đĩa thạch sôcôla khác, ủ ấm ở nhiệt độ 37°C /5% CO<sub>2</sub>/16 - 24 giờ, ngày tiếp theo làm thêm

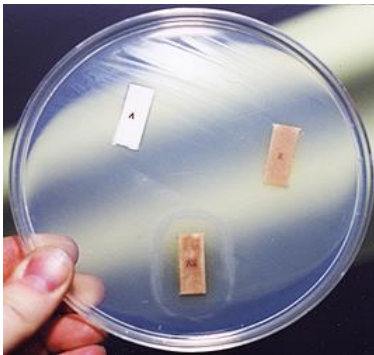
các thử nghiệm sau để khẳng định (nếu chỉ thấy thuần một loại khuẩn lạc (khóm) thì không cần cấy thuần mà có thể làm luôn các bước khẳng định).

### 8.2.3. Thử nghiệm xác định

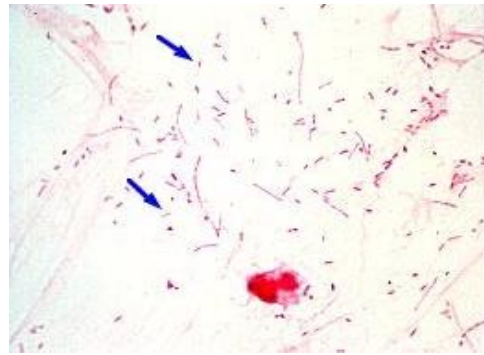
#### a. Thử nghiệm xác định nhu cầu phát triển cần yếu tố X và V

- Lấy một đĩa môi trường thạch dinh dưỡng Trypticase Soy, cấy vi khuẩn *H. influenzae* lên bằng cách rìa dày theo ba hướng trên đĩa môi trường, sau đó đặt các khoanh giấy X, V và XV lên, khoảng cách giữa các khoanh giấy ít nhất 4 - 5cm, ủ ở 37°C/5% CO<sub>2</sub> qua đêm, đọc kết quả dương tính khi thấy vi khuẩn chỉ mọc quanh khoanh giấy XV và chỉ mọc giữa 2 khoanh X và V do vi khuẩn cần cả 2 yếu tố trong quá trình phát triển. Nếu vi khuẩn chỉ mọc quanh khoanh giấy X là *H. aphrophilus*, nếu chỉ mọc quanh khoanh giấy V là *H. parainfluenzae*, nếu chỉ mọc quanh khoanh X và V nhưng có vòng tan huyết là *H. haemolyticus*.

- Thử nghiệm này có thể thay thế bằng thử nghiệm “vệ tinh” như sau: rìa cấy chủng nghi ngờ *H. influenzae* theo đường zic zắc trên môi trường thạch máu 5% rồi rìa một đường vi khuẩn *S. aureus* cắt ngang đường cấy *H. influenzae*, ủ ở 37°C /5% CO<sub>2</sub> qua đêm, khi thấy vi khuẩn mọc quanh đường cấy tụ cầu vàng là dương tính (vi khuẩn mọc quanh *S. aureus* là *H. influenzae* vì *S. aureus* có khả năng sinh ra yếu tố V trong quá trình phát triển), với thử nghiệm vệ tinh phải chú ý làm như vậy trên một đĩa thạch thường (TSA) để làm chứng âm.



Đĩa thạch với các đĩa XV, X, V



Hình ảnh nhuộm Gram *Haemophilus*

#### b. Thử nghiệm porphyrin: (nếu có nghi ngờ)

Nhằm mục đích xác định chính xác nhu cầu cần yếu tố X của vi khuẩn (loại bỏ các trường hợp yếu tố X có thể có từ môi trường nuôi cấy ban đầu hoặc các môi trường dùng trong thử nghiệm đã bị nhiễm yếu tố X từ trước hoặc vi khuẩn có khả năng tổng hợp yếu tố X). Lấy 0,5ml  $\beta$ -aminolevulinic acid (2mM  $\beta$ -aminolevulinic acid hydrochloride-Sigma; 0,8 mM MgSO<sub>4</sub> trong 0,1 M đệm PBS pH. 6,9 giữ ở 4°C) vào trong 1 ống nghiệm vô khuẩn, cấy một vòng que cấy đầy vi khuẩn, ủ ở nhiệt độ 37°C từ 4 -24 giờ, đọc kết quả dưới kính hiển vi huỳnh quang, dương tính khi thấy các tế bào vi khuẩn hoặc huyền dịch có màu đỏ. Bằng cách khác, nhỏ 0,5ml thuốc thử Kovacs, lắc

manh và chờ đến khi huyền dịch phân tán thành các lớp, dương tính khi thấy lớp nước ở thấp chuyển màu đỏ hay hồng (chứng tỏ sự có mặt của porphobilinogen).

#### 8.2.4. Xác định type huyết thanh của *H. influenzae*

Ngoài type sinh học, *H. influenzae* có vỏ còn phân tán thành 6 typ huyết thanh khác nhau tùy theo đặc tính kháng nguyên của vỏ polysaccarit, đánh dấu từ a đến f. Các nghiên cứu đã cho thấy 85- 90% loại *H. influenzae* có vỏ gây nhiễm khuẩn nghiêm trọng thuộc type huyết thanh b.

##### a. Vật liệu

Kháng huyết thanh kháng *H. influenzae* là Poly, a, b, c, d, e, f; dung dịch formalin để bất hoạt vi khuẩn (0,5% formalin trong nước muối sinh lý); ống nghiệm sạch, lam kính sạch, pipet chính xác và các đầu tip 20 $\mu$ l và 100 $\mu$ l.

##### b. Cách làm

Lấy một ống nghiệm chứa 0,5ml NaCl/0,5% Formalin, hòa vào một ăng đầy vi khuẩn tạo thành huyền dịch có độ đục tương đương 1 hoặc 2 Mc Farland, nhỏ 1 giọt huyền dịch vi khuẩn lên lam kính (15 $\mu$ l) và một giọt kháng huyết thanh đa giá (15 $\mu$ l), trộn đều bằng tăm gỗ hoặc tăm nhựa, lắc nhẹ phiến kính và quan sát ngay sự ngưng kết bằng mắt thường. Phản ứng dương tính khi thấy xuất hiện các hạt ngưng kết (trong vòng 1 phút), sau đó thực hiện phản ứng ngưng kết với các typ huyết thanh còn lại (a, b, c, d, f) với cách làm tương tự như trên để tìm được typ huyết thanh của vi khuẩn. Nếu không thấy hiện tượng ngưng kết với kháng huyết thanh đa giá có nghĩa là vi khuẩn thuộc loại không định được typ huyết thanh, do đó không cần thực hiện phản ứng với các typ huyết thanh còn lại (đa giá có nghĩa là bao gồm tất cả 6 typ huyết thanh đơn từ a đến f). Nên làm chứng âm với huyền dịch vi khuẩn và nước muối sinh lý (kiểm soát sự ngưng kết giả).

#### 8.2.5. Xác định sự có mặt enzym $\beta$ -lactamase

Sử dụng khoanh giấy Cefinase (nitrocefim), thấm ướt khoanh giấy bằng NaCl 0,9%, dùng que nhựa quét khuẩn lạc (khóm) Hib lên trên, hoặc đặt khoanh giấy Cefinase lên lam kính rồi nhỏ 1 giọt huyền dịch vi khuẩn Hib pha trong NaCl 0,9% lên trên, nếu khoanh giấy chuyển màu hồng là phản ứng dương tính (vi khuẩn sản xuất enzym  $\beta$ -lactamase). Thử nghiệm này được dùng để sơ bộ xác định khả năng kháng thuốc kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam của Hib.

#### 8.2.6. Các tiêu chuẩn xác định *H. influenzae*

- Khuẩn lạc (khóm) nhỏ, vòng nhẹ, xám nhạt (trên thạch sôcôla), có mùi đặc trưng. Khuẩn lạc (khóm) trong xám nhẹ, óng ánh khi chiếu sáng (trên thạch máu thờ 7%). Không gây tan huyết môi trường nuôi cấy.

- Là cầu trực khuẩn nhỏ, mảnh, đa dạng, bắt màu Gram âm.

- Phát triển được cần có đủ yếu tố X và V.

- Định typ huyết thanh: Các chủng gây bệnh hầu hết thuộc typ b (nếu điều kiện)

### 8.3. Một số kỹ thuật phát hiện *H. influenzae* từ bệnh phẩm

Ngày nay, để xác định nguyên nhân gây nhiễm trùng là vi khuẩn *H. influenzae*, một số kỹ thuật được ứng dụng như sau:

- Phát hiện kháng nguyên vỏ polysaccharide trực tiếp từ bệnh phẩm, đặc biệt bệnh phẩm dịch não tủy của bệnh nhân viêm màng não mủ bằng các phản ứng miễn dịch.

- Phát hiện bằng kỹ thuật PCR.

### 8.4. Phân biệt các loại *Haemophilus*

Vi khuẩn	Tan máu (tan máu (tiêu huyết) $\beta$ )	X	V	XV
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-	+
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	-	-	+	+
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	-	+/-	-	+
<i>Haemophilus hemolyticus</i>	+	-	-	+
<i>Haemophilus parahemolyticus</i>	+	-	+	+
<i>Haemophilus ducreyi</i>	-	+	-	+

\* **Lưu ý:** kết quả dương tính (+) khi có vi khuẩn mọc xung quanh các đĩa X, V, XV.

## 9. Diễn giải và báo cáo kết quả

Tùy theo kết quả định danh, có thể báo cáo các kết quả sau: *H. influenzae*. Kết quả định typ sinh học (nếu có). Kết quả  $\beta$ -lactamase (nếu có).

## 10. Lưu ý (cảnh báo)

Những sai lệch có thể xảy ra: Các thử nghiệm X, V, XV âm tính giả, dẫn đến chẩn đoán nhầm các loại vi khuẩn *Haemophilus*.

## 11. Lưu trữ hồ sơ

Ghi sổ trả kết quả, vào các biểu mẫu liên quan đến quy trình và lưu trữ hồ sơ.

# ĐỊNH DANH VI KHUẨN CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

## 1. Mục đích

Mục đích của quy trình này hướng dẫn phương pháp phát hiện và định danh vi khuẩn *Corynebacterium diphtheriae* (gây bệnh bạch hầu). Đây là bệnh cảnh nhiễm trùng cấp đường hô hấp (họng, thanh quản) có khả năng lây truyền cao trong cộng đồng.

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này áp dụng cho khoa/phòng xét nghiệm Vi sinh khi tiến hành nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm.

## 3. Trách nhiệm

- Phòng xét nghiệm có nhiệm vụ nuôi cấy, thực hiện các thử nghiệm định danh vi khuẩn theo đúng quy trình chuyên môn và an toàn sinh học.

- Nhân viên thực hiện: Đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh y học.

- Nhân viên nhận định, giám sát và phê duyệt kết quả: Có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh y học.

## 4. Nguyên tắc

Định danh vi khuẩn *Corynebacterium diphtheria* dựa vào các đặc tính nuôi cấy, hình thái vi khuẩn, khuẩn lạc (khóm) trên các môi trường chọn lọc và các phản ứng sinh hóa đặc trưng.

## 5. Trang thiết bị và vật tư

### a. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO<sub>2</sub> hoặc thiết bị tạo CO<sub>2</sub>

### b. Dụng cụ

- Pipette vô trùng
- Que cấy 1 µL
- Đèn cồn
- Lam kính
- Dầu soi

### **c. Vật liệu**

*Môi trường nuôi cấy:*

- Blood Agar (BA): Thạch máu
- Các môi trường chọn lọc: Cystine Tellurite Blood Agar (CTBA), Tinsdale Agar (TIN), Loeffler Agar (LAS).
- Môi trường tăng sinh Todd-Hewitt.
- Sinh phẩm:
- Bộ nhuộm Gram
- Bộ nhuộm Alkaline methylene blue (bắt buộc)
- Hydrogen peroxide 3% (thử nghiệm catalase)
- Các thử nghiệm sinh hóa: Nitrate, Urea, di động, Esculine, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (để làm thử nghiệm CAMP test).

### **6. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng để đảm bảo chất lượng.
- Chủng vi khuẩn chuẩn *Corynebacterium diphtheria* ATCC 13812.

### **7. An toàn**

Áp dụng tiêu chuẩn an toàn sinh học cấp II

### **8. Nội dung thực hiện**

#### **a. Phương pháp thu thập, vận chuyển và bảo quản bệnh phẩm**

*Phương pháp thu thập bệnh phẩm:*

- Dùng tăm bông (que gòn) để thu thập bệnh phẩm vùng mũi-họng-thanh quản.
- Gạt bỏ lớp màng trắng phủ trên vùng mô viêm nhiễm. Phết tăm bông (que gòn) vào vùng mô viêm.
- Thu thập bệnh phẩm tại nhiều vị trí để tăng khả năng phân lập vi khuẩn.

*Phương pháp bảo quản và vận chuyển mẫu:*

- Sử dụng môi trường bảo quản và chuyên chở (ví dụ: môi trường Stuart-Amies) để bảo quản tăm bông (que gòn).
- Nuôi cấy vi khuẩn ngay để kịp thời phân lập và định danh vi khuẩn.
- Gửi mẫu kèm phiếu yêu cầu xét nghiệm. Trong phiếu yêu cầu xét nghiệm phải đầy đủ thông tin bệnh nhân, thời gian lấy mẫu, vị trí lấy mẫu, tiền sử chích ngừa (nếu có).

*Tiêu chuẩn từ chối:*

- Mẫu thu thập ở các vị trí giải phẫu mà vi khuẩn bạch hầu không gây bệnh.
- Mẫu không có phiếu xét nghiệm đi kèm.
- Mẫu được vận chuyển và bảo quản không đúng cách.
- Mẫu lấy quá 24 giờ mà không bảo quản trong môi trường vận chuyển silica gel.

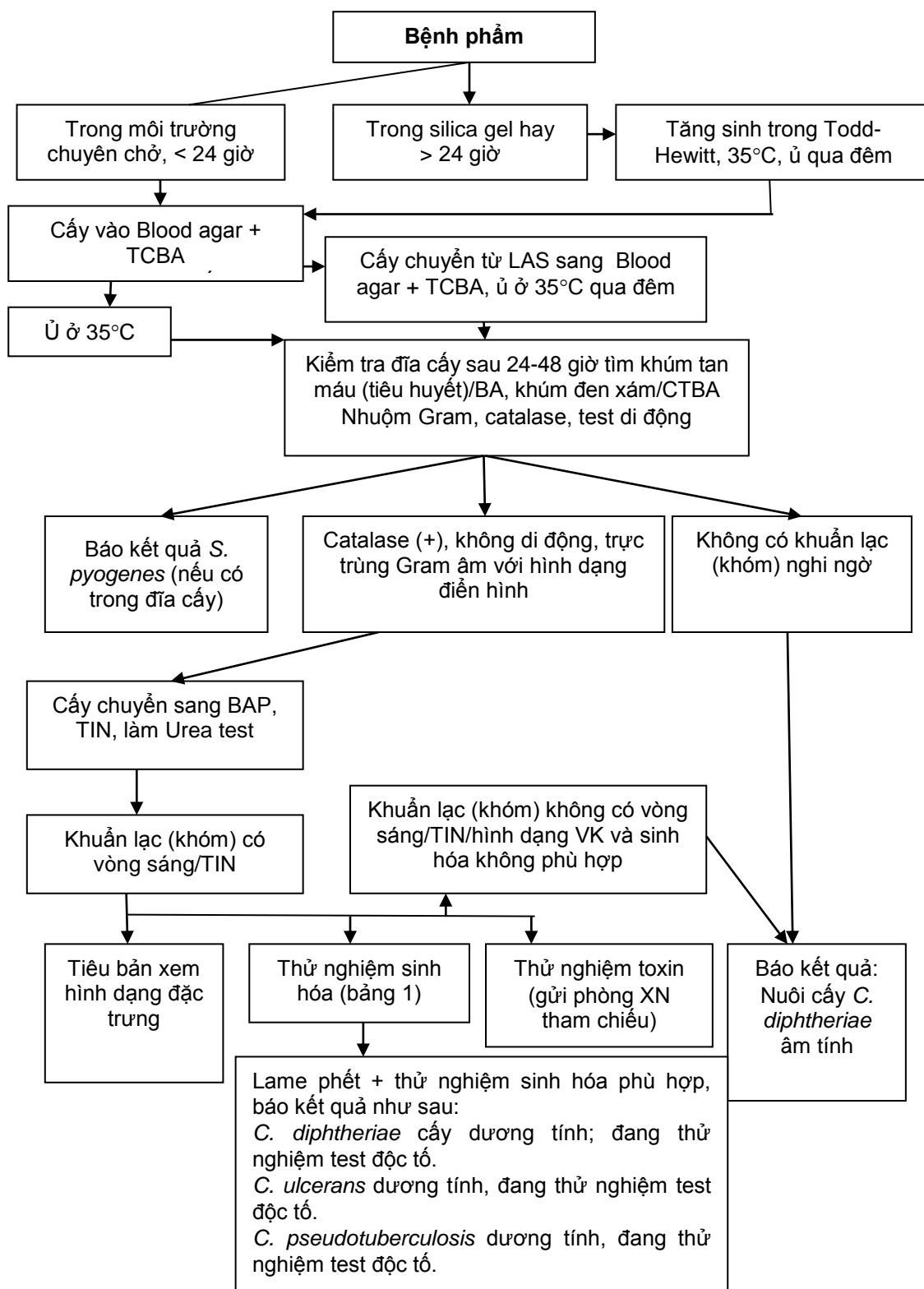
**b. Quy trình xử lý mẫu**

*Quy trình nuôi cấy:*

Tiến hành cấy chuyển trong tủ an toàn sinh học cấp II.

- Cấy que phết vào môi trường CTBA và BAP, ủ ở nhiệt độ 35<sup>0</sup> - 37°C, hiếu khí.
- Quy trình nuôi cấy và định danh được thể hiện theo sơ đồ dưới đây.





**Sơ đồ định danh *Corynebacterium diphtheriae***

# QUY TRÌNH NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIA*

## 1. Hình dạng đặc trưng của vi khuẩn *C. diphtheriae*

### 1.1. Hình dạng vi khuẩn

- Trên nhuộm Gram: Trực trùng Gram dương, sắp xếp vuông góc hay hàng rào. Nếu nhuộm trên môi trường cấy cũ thì có thể thành dạng cầu trực trùng Gram dương.

- Trên nhuộm Methylene Blue Alkaline: trực khuẩn có hạt nhiễm sắc, 2 đầu tận có thể phình to dạng chùy, sắp xếp hình hàng rào hay vuông góc; có các vạch bắt màu xanh đậm trên thân.

### 1.2. Hình dạng khuẩn lạc (khóm)

- Trên CTBA: Khuẩn lạc (khóm) màu xám đen, 1-3 mm, mùi tỏi.

+ Type sinh học intermedius: Khuẩn lạc (khóm) nhỏ nhất, dẹt.

+ Type sinh học gravis và mitis: Khuẩn lạc (khóm) to hơn, tròn, mượt hay nhăn nheo.

- Trên Blood agar:

+ Type sinh học intermedius: nhỏ, dẹt, mịn như bơ, trong suốt, không tan máu (tiêu huyết).

+ Type sinh học mitis và gravis: Khuẩn lạc (khóm) to hơn, tròn, tan máu (tiêu huyết) beta yếu.

+ *Streptococcus pyogenes*: Cầu khuẩn Gram dương đứng thành chuỗi, tan máu (tiêu huyết) beta rõ.

## 2. Thực hiện các phản ứng sinh hóa để định danh

- Vi khuẩn *C. ulcerans* và *C. pseudotuberculosis* có vòng sáng quanh khuẩn lạc (khóm) trên môi trường TIN

- Thử nghiệm Urea:

+ Vi khuẩn *C. ulcerans* và *C. pseudotuberculosis*: Urea dương tính.

+ Vi khuẩn *C. diphtheria*: Urea âm tính

**Bảng 1:** Tính chất sinh hóa của các loài *Corynebacterium* sinh độc tố

Vi khuẩn	Vòng sáng/TIN	Di động	Nitrate	Urea	Tan máu (tiêu huyết)
<i>C. diphtheriae</i>	+	+	+	-	+
<i>C. ulcerans</i>	+	+	-	+	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	+/-	+	+

## **2.1. Định danh sơ bộ *Corynebacterium diphtheriae***

Vi khuẩn được định danh sơ bộ là *Corynebacterium diphtheriae* khi có đủ các yếu tố sau:

Trực trùng Gram âm đa dạng, mọc tốt trên thạch máu, catalase (-), không di động, CAMP (-), Urea (-), khuẩn lạc (khóm) có vòng sáng trên TIN.

## **2.2. Định danh bằng các sinh phẩm thương mại**

Vi khuẩn có thể định danh bằng các sinh phẩm thương mại.

## **3. Diễn giải kết quả và báo cáo**

- Nếu nuôi cấy âm tính, báo cáo kết quả “Không phân lập được *Corynebacterium diphtheriae* sau 3 ngày nuôi cấy”.

- Nếu nuôi cấy dương tính:

Nếu các kết quả phản ứng sinh hóa phù hợp với vi khuẩn *C. diphtheriae*, báo kết quả “Định danh sơ bộ phát hiện vi khuẩn *Corynebacterium diphtheriae*”, gửi chủng vi khuẩn tới phòng xét nghiệm tham chiếu để khẳng định và xét nghiệm độc tố.

- Thông báo với bác sĩ điều trị và cơ quan quản lý dịch bệnh về kết quả dương tính.

- Lưu trữ thông tin.

## **4. Lưu ý (cảnh báo)**

- Quy trình trên chỉ hướng dẫn cách định danh vi khuẩn, chưa phát hiện đây là vi khuẩn sinh độc tố. Muốn kết luận đây là chủng vi khuẩn gây bệnh cần phải phát hiện độc tố.

- Lam soi nhuộm trực tiếp từ bệnh phẩm không đủ tin cậy để chẩn đoán vì nhiều loại vi khuẩn khác cũng có hình dạng trực trùng bắt hạt nhuộm sắc trên tiêu bản nhuộm Alkaline Methylene Blue.

- Muốn vòng sáng quanh khuẩn lạc (khóm) rõ hơn trên môi trường TIN, ủ môi trường ở điều kiện khí trường 5-10% CO<sub>2</sub>.

- Khuẩn lạc (khóm) màu đen trên CTBA có thể từ các vi khuẩn có khả năng giáng hóa tellurite thành tellurium (*Corynebacterium* spp., Staphylococci, Streptococci).

**5. Lưu trữ hồ sơ:** Lưu trữ theo quy định.



## **Chương IV**

# **KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ**

## **KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ KHOANH GIẤY KHUẾCH TÁN**

Kháng sinh có tác dụng ức chế hoặc tiêu diệt vi khuẩn một cách đặc hiệu. Mặc dù có rất nhiều loại kháng sinh được ra đời nhằm kiểm soát sự nhân lên và vi khuẩn nhưng vi khuẩn cũng không ngừng biến đổi tạo ra khả năng đề kháng kháng sinh với tốc độ rất nhanh, thậm chí còn nhanh hơn rất nhiều so với sự ra đời của một kháng sinh mới. Trong cuộc chiến giữa con người và vi khuẩn, rất cần việc sử dụng kháng sinh hợp lý để không những đảm bảo an toàn và hiệu quả trong điều trị mà còn hạn chế sự gia tăng các vi khuẩn đề kháng kháng sinh. Xét nghiệm kháng sinh đồ thực hiện tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng nhằm xác định khả năng ức chế in vitro của kháng sinh với vi khuẩn nhằm hai mục đích:

- Định hướng cho bác sĩ lâm sàng lựa chọn kháng sinh phù hợp cho từng bệnh nhân.
- Cung cấp các bằng chứng dịch tễ học về xu hướng đề kháng kháng sinh của các vi khuẩn trong từng giai đoạn, ở từng khu vực, là cơ sở để xây dựng các hướng dẫn điều trị kháng sinh.

Có hai kỹ thuật kháng sinh đồ là kỹ thuật kháng sinh đồ khoanh giấy khuếch tán và kỹ thuật kháng sinh đồ pha loãng.

### **1. Nguyên lý của kỹ thuật kháng sinh đồ khoanh giấy khuếch tán**

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn thử nghiệm được đánh giá dựa vào vùng ức chế tạo ra xung quanh khoanh giấy thấm kháng sinh. Khi đặt khoanh giấy kháng sinh trên bề mặt thạch, kháng sinh sẽ khuếch tán vào trong thạch; càng xa khoanh giấy, nồng độ kháng sinh càng giảm. Sự phát triển của vi khuẩn sẽ bị ức chế khi kháng sinh đạt đến một nồng độ nhất định. Dựa vào đường kính vùng ức chế và điểm gãy trong tài liệu hướng dẫn phiên giải kết quả kháng sinh đồ, mức độ nhạy cảm có thể phân chia thành phân loại **S** (susceptible - nhạy cảm), **I** (intermediate - trung gian), **R** (resistant - đề kháng) hoặc **NS** (non-susceptible - không nhạy cảm).

### **2. Phạm vi áp dụng**

- Quy trình này sử dụng đối với các chủng vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* và các vi khuẩn dễ nuôi cấy khác.

- Quy trình này cũng có thể áp dụng cho các chủng vi khuẩn khó nuôi cấy, vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối và với các chủng *Mycobacteria*, nhưng cần phải được thay đổi về môi trường, điều kiện nuôi cấy cho phù hợp theo các hướng dẫn chính thức khác.

### 3. Giải thích thuật ngữ

- Kháng sinh: Là những chất ngay ở nồng độ thấp đã có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt vi khuẩn một cách đặc hiệu bằng cách gây rối loạn phản ứng sinh học ở tầm phân tử.

- Thử nghiệm nhạy cảm với kháng sinh: là kỹ thuật xác định độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh.

- Khuếch tán trong thạch: Kháng sinh từ khoanh giấy đặt trên mặt thạch sẽ khuếch tán ra môi trường thạch xung quanh khoanh giấy.

- Khoanh giấy thấm kháng sinh: Khoanh giấy tròn thường có đường kính 6 mm được thấm một lượng kháng sinh nhất định.

- Độ đục chuẩn McFarland được sử dụng để hiệu chỉnh độ đục của huyền dịch vi khuẩn sao cho huyền dịch vi khuẩn sau khi pha sẽ chứa một số lượng vi khuẩn nhất định tương đương với độ đục chuẩn sử dụng. Độ đục chuẩn được pha chế từ  $\text{BaCl}_2$  và  $\text{H}_2\text{SO}_4$  để được  $\text{BaSO}_4$  kết tủa tạo nên độ đục của dung dịch chuẩn. Độ đục chuẩn McFarland 0,5 được pha từ 0,05 ml  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,175% với 9,95 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%. Huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương đương với độ đục của McFarland 0,5 chứa khoảng  $1 - 2 \times 10^8$  CFU/ml đối với *E. coli* ATCC 25922.

- Vùng ức chế: Là vùng mà không nhìn thấy sự phát triển vi khuẩn.

- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Viện Chuẩn thức về Lâm sàng và Xét nghiệm.

- EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing): Ủy ban châu Âu về Thử nghiệm kháng sinh đồ.

- S (Susceptibility) - Nhạy cảm: Một vi khuẩn được coi là nhạy cảm với một kháng sinh nào đó có nghĩa là khi nhiễm trùng do vi khuẩn này gây ra sẽ đáp ứng với điều trị bằng kháng sinh thử nghiệm với liều lượng được khuyến cáo.

- I (Intermediate) - Trung gian: Khái niệm trung gian có thể được hiểu ở hai tình huống sau:

+ Khi áp dụng cho một chủng vi khuẩn coi là nhạy cảm trung bình với một kháng sinh nào đó có nghĩa là kháng sinh này có thể sử dụng cho điều trị nhưng với liều lượng cao hơn để kháng sinh có thể tập trung nhiều hơn đến ổ nhiễm trùng hoặc do độc tính thấp của kháng sinh nên tương đối an toàn khi sử dụng liều cao.

+ Khi áp dụng cho chủng vi khuẩn có độ nhạy cảm trung bình với một kháng sinh có độc tính cao có nghĩa là không thể sử dụng kháng sinh này ở liều cao hơn cho điều trị. Trong trường hợp này, phân loại trung gian được hiểu là ranh giới của nhạy cảm và đề kháng.

+ R (Resistant) - Đề kháng: Vi khuẩn không đáp ứng với kháng sinh này khi điều trị cho dù liều lượng như thế nào hay vị trí ổ nhiễm trùng ở đâu.

#### **4. Trang thiết bị, sinh phẩm**

- Tủ ấm
- Máy trộn, lắc
- Đĩa thạch Mueller-Hinton
- Khoanh giấy kháng sinh
- Độ đục chuẩn McFarland 0,5
- Nước muối 0,9% vô trùng
- Tấm bông (que gòn) vô trùng
- Đèn cồn, que cấy, panh, ống nghiệm

#### **5. Các bước tiến hành**

##### **a. Chuẩn bị môi trường**

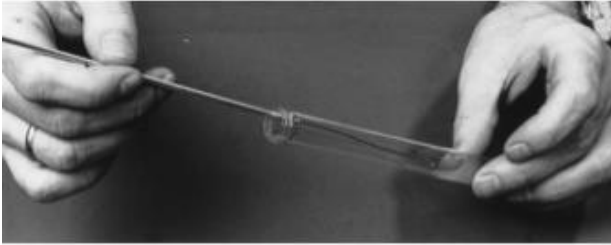
Môi trường sử dụng làm thử nghiệm kháng sinh đồ cho các vi khuẩn hiếu khí để nuôi cấy là môi trường thạch đĩa Muller-Hinton có độ dày  $4 \pm 0,5$  mm.

##### **b. Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn**

- Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm phải thuần và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 18-24 giờ) và nên từ môi trường không có chất chọn lọc như cấy trên thạch thường, thạch máu...).

- Chuẩn bị huyền dịch trực tiếp từ khuẩn lạc (khóm): Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ 3-5 khuẩn lạc (khóm) có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống nước muối sinh lý, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất. So sánh độ đục của huyền dịch vi khuẩn với độ đục của ống McFarland 0,5. Điều chỉnh thêm vi khuẩn hoặc thêm nước muối vào ống canh khuẩn sao cho ống canh khuẩn có độ đục tương đương với độ đục của ống McFarland 0,5. Có thể dùng tấm bìa trắng có đường kẻ ngang màu đen làm nền để so sánh độ đục. Huyền dịch vi khuẩn sau khi pha, phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút.

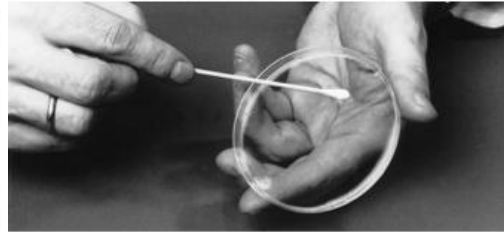
- Chuẩn bị huyền dịch từ canh khuẩn nuôi cấy: Có thể sử dụng canh khuẩn nuôi cấy để chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn. Trong một số trường hợp như khuẩn lạc (khóm) khó hoà tan để có huyền dịch đồng nhất hay khi không có ngay khuẩn lạc (khóm) mới cấy 24 giờ thì phương pháp này được lựa chọn thực hiện. Nhặt ít nhất 3 - 5 khuẩn lạc (khóm) chuyển vào 4 - 5 ml canh thang nuôi cấy, ủ ở  $35^{\circ}\text{C}$  cho đến khi có được huyền dịch có độ đục tương ứng với độ đục của McFarland 0,5 (thường sau 2 - 6 giờ nuôi cấy). Có thể dùng nước muối sinh lý để hiệu chỉnh độ đục của canh khuẩn nuôi cấy để có được huyền dịch cần thiết.



(Nguồn *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. 2<sup>nd</sup> edition. World Health Organization. 2003)

### **c. Dàn đều vi khuẩn trên mặt thạch**

Dùng tăm bông (que gòn) vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn tăm bông (que gòn) trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt phần huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông (que gòn). Sau đó, ria đều que tăm bông (que gòn) trên toàn bộ mặt đĩa thạch Mueller-Hinton, xoay đều đĩa thạch theo góc 60° rồi ria đều que tăm bông (que gòn) Cứ tiếp tục xoay đĩa một góc 60° và ria que tăm bông (que gòn) để sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt đĩa thạch. Cuối cùng, ria tăm bông (que gòn) vòng quanh bờ mép của mặt thạch. Đóng nắp đĩa thạch và để đĩa thạch sau ria cấy vài phút ở nhiệt độ phòng cho mặt thạch se lại.



(Nguồn *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. 2<sup>nd</sup> edition. World Health Organization. 2003)

### **d. Đặt khoanh giấy kháng sinh**

- Có thể dùng panh kẹp hoặc đầu kim vô trùng để đặt các khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch. Các khoanh giấy sau khi đặt cần được ấn xuống vừa phải để đảm bảo



chúng được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Tối đa chỉ nên đặt 6 khoanh giấy trên đĩa thạch đường kính 9-10 cm, 12 khoanh cho đĩa đường kính 15 cm. Thông thường, nên đặt 6 khoanh cách đều nhau và cách gờ của đĩa thạch 15 mm. Trong vòng 15 phút sau khi đặt khoanh giấy kháng sinh, các đĩa thạch phải được lật úp để trong tủ ấm  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  trong vòng 16-18 giờ trong điều kiện khí trường bình thường.

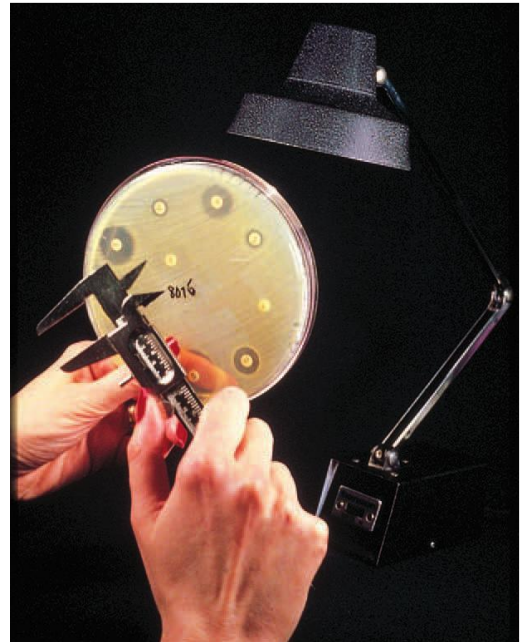
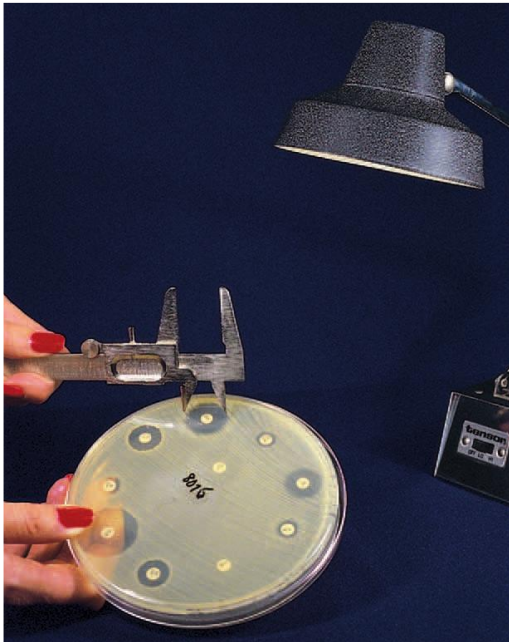


(Nguồn *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. 2<sup>nd</sup> edition. World Health Organization. 2003)

- Trong trường hợp làm kháng sinh đồ cho các vi khuẩn không mọc được trên môi trường Mueller-Hinton, cần sử dụng các môi trường phù hợp với từng loài vi khuẩn. Ví dụ, môi trường Mueller-Hinton có bổ sung 5% máu cừu cho *Streptococci*, môi trường *Haemophilus* Test Medium (HTM) cho *Haemophilus* hay môi trường GC có chất bổ sung dùng cho *Neisseria*... Mặc dù nuôi cấy ở điều kiện khí trường có CO<sub>2</sub> là cần thiết cho một số các vi khuẩn khó nuôi cấy, song điều kiện khí trường như vậy không thích hợp cho kỹ thuật kháng sinh đồ cho hầu hết các vi khuẩn khác. Nuôi cấy trong điều kiện có CO<sub>2</sub> sẽ làm giảm pH gây ảnh hưởng đến hoạt tính của một số kháng sinh.

#### **f. Đọc và nhận định kết quả**

Sau khi nuôi cấy qua đêm (16-18 giờ), kiểm tra đĩa thạch và chỉ đọc kết quả khi vi khuẩn thử nghiệm mọc đồng đều trên mặt thạch, các khuẩn lạc (khóm) mọc dày sát cạnh nhau nhưng không chồng lên nhau thành thảm dày hoặc không quá thưa có các khe giữa các khuẩn lạc (khóm). Vùng ức chế tạo ra có hình tròn đều. Dùng thước kẻ có chia vạch đến mm hoặc thước kẹp đặt lên mặt đáy của đĩa thạch, không mở nắp đĩa thạch, đo đường kính vùng ức chế hoàn toàn (bao gồm cả đường kính của khoanh giấy kháng sinh) tính theo mm. Khi đó, nên đặt đĩa cách nền đen khoảng vài cm và dưới ánh sáng rọi. Trong một số trường hợp đặc biệt, cần lưu ý khi đo đường kính vùng ức chế như: (i) Khi môi trường thử nghiệm kháng sinh đồ có thêm máu, mở đĩa đo đường kính vùng ức chế; (ii) Khi thử nghiệm *Staphylococcus* spp. với oxacillin hoặc vancomycin, *Enterococcus* với vancomycin, cần ủ ấm đủ 24 giờ và gờ cao đĩa đọc dưới ánh sáng xuyên để kiểm tra được vùng vi khuẩn mọc yếu ở bên trong vùng ức chế. Nếu nhìn thấy có vi khuẩn mọc bên trong vùng ức chế có nghĩa là chủng vi khuẩn thử nghiệm đề kháng với oxacillin hoặc vancomycin; (iii) Khi thử nghiệm *Staphylococcus* spp. với linezolid, đọc đĩa dưới ánh sáng xuyên.



(Nguồn *Textbook of diagnostic microbiology*. Connie R. Mahon, Donald C. Lehman, George Manuselis. 3<sup>rd</sup> edition. Saunders Elsevier. 2007)

Bờ của vùng ức chế là vùng ranh giới nơi mà nhìn bằng mắt thường không thấy có vi khuẩn mọc. Bỏ qua những khuẩn lạc (khóm) mọc rất bé mà phải cần kính lúp mới phát hiện được ở bờ vùng ức chế. Những khuẩn lạc (khóm) rất nhỏ mọc ở sát rìa vùng ức chế hoặc làn sóng lan của các chủng *Proteus* có xu hướng mọc lan có thể không cần quan tâm. Đo vùng ức chế rõ ràng. Những khuẩn lạc (khóm) mọc ở bên trong vùng ức chế không được bỏ qua. Các khuẩn lạc (khóm) này có thể do bị tạp nhiễm từ ngoài vào hoặc do vi khuẩn thử nghiệm không thuần nhất, hoặc cũng có thể là quần thể của những biến chủng đề kháng kháng sinh. Khi có các khuẩn lạc (khóm) mọc ở trong vùng ức chế như vậy mà xác định không phải tạp nhiễm, cần làm lại thử nghiệm với biến chủng đề kháng để có kết quả kháng sinh đồ theo biến chủng đề kháng. Những chủng vi khuẩn phải làm thử nghiệm kháng sinh đồ trên thạch máu, nên bỏ nắp đĩa thạch để đo trực tiếp đường kính vùng ức chế ngay trên mặt thạch. Chú ý đo đường kính vùng ức chế chứ không phải đường kính vùng tan máu (tiêu huyết). Với khoan giấy sulfonamide và co-trimoxazole, có thể có sự tăng sinh nhẹ của vi khuẩn ở trong vùng ức chế, những sự tăng sinh nhẹ như vậy không cần quan tâm đến. Khi các chủng *Staphylococci* có khả năng sinh  $\beta$ -lactamase thử nghiệm với các benzyl penicillin, dù vùng vô khuẩn có rõ ràng, bờ rõ vẫn phải đọc kết quả là đề kháng. Một số loài *Proteus* có thể tạo ra làn sóng vào trong vùng ức chế quanh một số khoan giấy kháng sinh nhưng các vùng ức chế vẫn có thể nhận biết rõ ràng và chỉ có làn sóng rất mỏng nhẹ thì không cần quan tâm đến.

Đường kính vùng ức chế tính ra mm được so sánh với các giá trị điểm gãy trong tài liệu CLSI hoặc EUCAST để nhận định là nhạy cảm (S), đề kháng trung gian (I) hay đề kháng (R).

## **6. Các yếu tố kỹ thuật ảnh hưởng đến đường kính vùng ức chế**

### **a. Mật độ của canh khuẩn**

Nếu canh khuẩn quá loãng sẽ làm vùng ức chế bị mở rộng. Vi khuẩn nhạy cảm vẫn là nhạy cảm khi đường kính vùng ức chế bị mở rộng ra nhưng những chủng vi khuẩn đề kháng có thể sẽ được đọc kết quả là chủng nhạy cảm. Ngược lại, nếu canh khuẩn quá đặc, vùng ức chế sẽ bị thu hẹp và những chủng nhạy cảm có thể được đọc kết quả là chủng đề kháng. Kết quả thích hợp nhất khi canh khuẩn có mật độ vi khuẩn làm cho các khuẩn lạc (khóm) mọc sát liền nhau nhưng không chồng chéo lên nhau.

### **b. Thời gian đặt khoanh giấy**

Sau khi dàn vi khuẩn lên mặt đĩa thạch, nếu để đĩa thạch ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài hơn thời gian qui định, sẽ có thể có sự nhân lên của vi khuẩn trước khi đặt khoanh giấy kháng sinh. Như vậy, sẽ làm giảm đường kính vùng ức chế và có thể làm cho chủng nhạy cảm được đọc kết quả là chủng đề kháng.

### **c. Nhiệt độ nuôi cấy**

Thử nghiệm kháng sinh đồ thường được ủ ấm ở  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  để cho sự phát triển tối ưu của vi khuẩn. Nếu nhiệt độ thấp hơn, thời gian để cho sự phát triển tốt của vi khuẩn sẽ đòi hỏi phải dài hơn và làm cho đường kính vùng ức chế cũng sẽ bị rộng ra. Khi chủng thử nghiệm là *S. aureus* đề kháng không đồng nhất thử nghiệm với methicillin (oxacillin), những quần thể đề kháng được phát hiện khi nuôi cấy ở  $35^\circ\text{C}$ . Nếu nuôi cấy ở nhiệt độ cao hơn, toàn bộ quần thể vi khuẩn bao gồm cả vi khuẩn đề kháng đều cho kết quả là nhạy cảm. Ở  $35^\circ\text{C}$  hoặc nhiệt độ thấp hơn, khuẩn lạc (khóm) của các chủng đề kháng mọc bên trong vùng ức chế. Những khuẩn lạc (khóm) của các chủng đề kháng này có thể quan sát được dễ dàng hơn nếu đĩa thạch được để ra ngoài nhiệt độ phòng vài giờ trước khi đọc kết quả. Các khuẩn lạc (khóm) này luôn luôn nên được kiểm tra lại để loại trừ khả năng là các khuẩn lạc (khóm) bội nhiễm.

### **d. Thời gian nuôi cấy**

Đối với kỹ thuật kháng sinh đồ, kết quả chỉ nên đọc sau 16-24 giờ tùy theo từng loài vi khuẩn theo hướng dẫn CLSI hoặc EUCAST.

### **e. Đường kính đĩa, độ dày thạch và khoảng cách giữa các khoanh giấy**

- Vùng ức chế sẽ bị mở rộng nếu đĩa thạch mỏng, và ngược lại nếu đĩa thạch dày, vùng ức chế sẽ bị thu hẹp. Nếu độ dày của đĩa thạch chỉ thay đổi chút ít so với tiêu chuẩn thì kết quả kháng sinh đồ bị ảnh hưởng không đáng kể. Độ dày của đĩa thạch tiêu chuẩn là  $4 \pm 0,5$  mm.

- Khoảng cách giữa các khoanh giấy đặt hợp lý để tránh các vùng ức chế bị chồng chéo lên nhau hoặc bị biến dạng ở những vùng gần gờ đĩa thạch.

### **f. Hàm lượng kháng sinh**

Đường kính vùng ức chế liên quan đến hàm lượng kháng sinh thấm trong khoanh giấy. Nếu hàm lượng kháng sinh bị giảm do bị phá hủy trong quá trình bảo quản, vùng ức chế sẽ bị thu nhỏ lại tương ứng với lượng kháng sinh đã bị thiếu hụt.

### **g. Thành phần của môi trường**

- Môi trường có ảnh hưởng đến đường kính vùng ức chế do môi trường có ảnh hưởng lên khả năng phát triển của vi khuẩn, khả năng khuếch tán của kháng sinh và hoạt tính của kháng sinh. Do vậy, việc sử dụng môi trường thích hợp cho từng phương pháp làm kháng sinh đồ là rất cần thiết.

- Thử nghiệm trên cùng một chủng vi khuẩn cũng đã cho thấy có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến kết quả kháng sinh đồ nên phương pháp khoanh giấy khếch tán cần được chuẩn hóa. Những thay đổi có liên quan đến các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả có thể đưa đến thông báo không chính xác cho bác sĩ lâm sàng.

- Độ chính xác và độ đúng của phương pháp cần được kiểm soát bằng chương trình kiểm soát chất lượng. Những sai lệch cần được phát hiện kịp thời và hiệu chỉnh ngay.

**7. Kiểm soát chất lượng:** xem bài đảm bảo chất lượng kháng sinh đồ

# KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ ĐỊNH LƯỢNG

Kỹ thuật kháng sinh đồ khoan giấy khuếch tán là kỹ thuật kháng sinh đồ định tính, chỉ cho biết chủng vi khuẩn thử nghiệm nhạy cảm, đề kháng trung gian hay đề kháng với kháng sinh. Kỹ thuật kháng sinh đồ pha loãng là kỹ thuật kháng sinh đồ định lượng. Nó không chỉ trả lời được câu hỏi chủng vi khuẩn thử nghiệm nhạy cảm, đề kháng trung gian hay đề kháng với kháng sinh mà nó còn cho biết chủng vi khuẩn nhạy cảm, đề kháng trung gian hay đề kháng với kháng sinh ở nồng độ kháng sinh nào. Giá trị của nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum inhibitory concentration - MIC) có thể hỗ trợ các bác sĩ lâm sàng quyết định liều điều trị tối ưu cho bệnh nhân. Các kỹ thuật kháng sinh đồ định lượng bao gồm kháng sinh đồ pha loãng trong thạch, kháng sinh đồ pha loãng trong canh thang (pha loãng trong ống nghiệm và pha loãng trong các giếng nhỏ - vi pha loãng) và kháng sinh đồ dải giấy khuếch tán theo bậc nồng độ. Kỹ thuật kháng sinh đồ pha loãng được coi là phương pháp chuẩn xác định giá trị MIC nhưng kỹ thuật kháng sinh đồ dải giấy khuếch tán theo bậc nồng độ lại là phương pháp khả thi thực hiện tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Kỹ thuật vi pha loãng được trình bày dưới đây là phương pháp tiêu chuẩn xác định MIC và cũng có thể thực hiện được tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

## I. KHÁNG SINH ĐỒ PHA LOÃNG

### 1. Nguyên lý

Kháng sinh được hoà đều trong môi trường lỏng hoặc môi trường đặc nên tại bất kỳ điểm nào trong môi trường, nồng độ kháng sinh đều như nhau. Kháng sinh được pha loãng thành nhiều nồng độ khác nhau (thường là pha loãng theo cấp số nhân). Một lượng vi khuẩn nhất định như nhau được cấy vào môi trường có nồng độ kháng sinh khác nhau. Ở nồng độ kháng sinh nào còn thấy vi khuẩn phát triển là vi khuẩn có khả năng đề kháng với kháng sinh tại nồng độ đó. Nồng độ kháng sinh pha loãng nhất có khả năng ức chế được sự phát triển của vi khuẩn được gọi là nồng độ ức chế tối thiểu.

Giá trị MIC cho biết nồng độ kháng sinh cần đạt được tại ổ nhiễm trùng để có thể ức chế được căn nguyên gây bệnh. Tuy nhiên, giá trị MIC không phải là một giá trị tuyệt đối. Giá trị MIC thực có khi nằm giữa nồng độ ức chế tối thiểu có được khi đọc kết quả thử nghiệm và nồng độ kháng sinh thấp hơn ngay sát giá trị của MIC đọc kết quả. Ví dụ, khi pha loãng kháng sinh theo cấp số nhân bậc hai, thử nghiệm xác định MIC cho giá trị là 16 µg/ml nhưng giá trị MIC thực có thể nằm trong khoảng giữa của 16 µg/ml và 8 µg/ml. Dựa vào giá trị MIC và điểm gãy trong bảng chuẩn, mức độ nhạy cảm có thể phân chia thành phân loại **S** (susceptible - nhạy cảm), **I** (intermediate - trung gian), **R** (resistant - đề kháng) hoặc **NS** (non-susceptible - không nhạy cảm).

## 2. Phạm vi áp dụng

Quy trình này sử dụng đối với các chủng vi khuẩn hiếu khí hoặc hiếu kỵ khí tùy tiện, mọc tốt được trong môi trường canh thang Mueller-Hinton. Quy trình này cũng có thể áp dụng cho các chủng vi khuẩn khó nuôi cấy, vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối và với các chủng *Mycobacteria*, nhưng cần phải được thay đổi về môi trường, điều kiện nuôi cấy cho phù hợp theo các hướng dẫn chính thức khác.

## 3. Giải thích thuật ngữ

- Kháng sinh: Là những chất ngay ở nồng độ thấp đã có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt vi khuẩn một cách đặc hiệu bằng cách gây rối loạn phản ứng sinh học ở tầm phân tử.

- Thử nghiệm nhạy cảm với kháng sinh: Là kỹ thuật xác định độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh.

- Độ đục chuẩn McFarland được sử dụng để hiệu chỉnh độ đục của huyền dịch vi khuẩn sao cho huyền dịch vi khuẩn sau khi pha sẽ chứa một số lượng vi khuẩn nhất định tương đương với độ đục chuẩn sử dụng. Độ đục chuẩn được pha chế từ BaCl<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> để được BaSO<sub>4</sub> kết tủa tạo nên độ đục của dung dịch chuẩn. Độ đục chuẩn McFarland 0,5 được pha từ 0,05 ml BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,175% với 9,95 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%. Huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương đương với độ đục của McFarland 0,5 chứa khoảng 1- 2 x 10<sup>8</sup> CFU/ml đối với *E. coli* ATCC 25922.

- Độ nhạy cảm với kháng sinh: mức độ nhạy cảm của một vi khuẩn với kháng sinh.

- Kháng kháng sinh: Là hiện tượng vi khuẩn không bị ức chế hay bị tiêu diệt ở nồng độ kháng sinh cao hơn mức thông thường.

- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Viện chuẩn thức về lâm sàng và xét nghiệm.

- S (Susceptibility) - Nhạy cảm: Một vi khuẩn được coi là nhạy cảm với một kháng sinh nào đó có nghĩa là khi nhiễm trùng do vi khuẩn này gây ra sẽ đáp ứng với điều trị bằng kháng sinh thử nghiệm với liều lượng được khuyến cáo.

- SDD (Susceptible-dose dependent) - Nhạy cảm phụ thuộc liều: Độ nhạy cảm của chủng vi khuẩn phụ thuộc vào chế độ liều được sử dụng cho bệnh nhân. Để đạt được nồng độ thuốc có hiệu quả trên lâm sàng ở các chủng có kết quả thử nghiệm là SDD, cần phải sử dụng một chế độ liều sao cho vi khuẩn tại ổ nhiễm trùng sẽ phải tiếp xúc với kháng sinh có nồng độ cao hơn liều kháng sinh được sử dụng để xây dựng nên giá trị điểm gây nhạy cảm. Thường thì nên sử dụng chế độ liều cao nhất được chấp nhận vì nồng độ kháng sinh càng cao thì khả năng tiêu diệt các chủng SDD càng lớn.

- I (Intermediate) - Trung gian: Khái niệm trung gian có thể được hiểu ở hai tình huống sau:

+ Khi áp dụng cho một chủng vi khuẩn coi là nhạy cảm trung bình với một kháng sinh nào đó có nghĩa là kháng sinh này có thể sử dụng cho điều trị nhưng với liều lượng cao hơn để kháng sinh có thể tập trung nhiều hơn đến ổ nhiễm trùng hoặc do độc tính thấp của kháng sinh nên tương đối an toàn khi sử dụng liều cao.

+ Khi áp dụng cho chủng vi khuẩn có độ nhạy cảm trung bình với một kháng sinh có độc tính cao có nghĩa là không thể sử dụng kháng sinh này ở liều cao hơn cho điều trị. Trong trường hợp này, phân loại trung gian được hiểu là ranh giới của nhạy cảm và đề kháng.

- R (Resistant) - Đề kháng: Vi khuẩn không đáp ứng với kháng sinh này khi điều trị cho dù liều lượng như thế nào hay vị trí ổ nhiễm trùng ở đâu.

- NS (Nonsusceptible) - Không nhạy cảm: Phân loại này được sử dụng cho các loài vi khuẩn chỉ có duy nhất phân loại nhạy cảm được thiết lập vì không thấy có hoặc rất hiếm các chủng vi khuẩn đề kháng. Với các chủng vi khuẩn có giá trị MIC cao hơn điểm gây nhạy cảm sẽ được phân loại là NS. Một chủng vi khuẩn khi được phân loại là NS không hẳn là chúng sở hữu một cơ chế đề kháng thuốc mà có thể là vẫn thuộc về quần thể vi khuẩn hoang dại không có cơ chế nào đề kháng thuốc nhưng tại thời điểm thiết lập điểm gây nhạy cảm không có các chủng như vậy trong quần thể chủng nghiên cứu. Trong thực hành lâm sàng, khi có chủng NS, cần kiểm tra lại tính chính xác của kết quả định danh vi khuẩn và kết quả kháng sinh đồ.

#### **4. Trang thiết bị, sinh phẩm**

- Tủ ấm
- Máy vortex
- Canh thang Mueller-Hinton 0,5 ml
- Kháng sinh bột sử dụng cho nghiên cứu thử nghiệm
- Độ đục chuẩn McFarland 0,5
- Nước muối 0,85% vô trùng
- Đèn cồn, que cấy, ống nghiệm

#### **5. Các bước tiến hành kỹ thuật pha loãng trong canh thang**

##### **a. Chuẩn bị và bảo quản dung dịch kháng sinh**

Chuẩn bị dung dịch kháng sinh gốc có nồng độ ít nhất là 10mg/ml hoặc gấp 10 lần nồng độ kháng sinh cao nhất cho thử nghiệm. Có kháng sinh có thể hoà tan trong nước, có kháng sinh phải hoà tan trong dung môi phù hợp. Trong trường hợp phải dùng dung môi hoà tan kháng sinh, nên dùng một lượng nhỏ dung môi để hoà tan kháng sinh rồi bổ sung nước cho đạt được nồng độ kháng sinh cần pha. Kháng sinh bột khi mua thường không đạt độ tinh khiết 100% nên khi dùng để pha dung dịch gốc cần chú ý đến hoạt tính của kháng sinh. Dung dịch kháng sinh gốc nên được bảo quản tốt nhất ở - 60°C, không bao giờ để ở nhiệt độ cao hơn - 20°C.

Từ nồng độ kháng sinh gốc, pha loãng trong canh thang Mueller-Hinton để được nồng độ kháng sinh gấp đôi nồng độ kháng sinh cao nhất cần thử nghiệm gọi là dung dịch kháng sinh thử nghiệm.

## **b. Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn**

Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm phải thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 18-24 giờ).

Chuẩn bị huyền dịch trực tiếp từ khuẩn lạc (khóm): Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ 3-5 khuẩn lạc (khóm) có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống nước muối sinh lý 5 ml, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất có độ đục bằng độ đục của ống McFarland 0,5. Pha loãng tiếp 100 lần để có ống canh khuẩn có nồng độ  $10^6$  CFU/ml. Huyền dịch vi khuẩn sau khi pha, phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút.

Chuẩn bị huyền dịch từ canh khuẩn nuôi cấy: Có thể sử dụng canh khuẩn nuôi cấy để chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn. Trong một số trường hợp như khuẩn lạc (khóm) khó hoà tan để có huyền dịch đồng nhất hay khi không có ngay khuẩn lạc (khóm) mới cấy 24 giờ thì phương pháp này được lựa chọn thực hiện. Nhặt ít nhất 3 - 5 khuẩn lạc (khóm) chuyển vào 4 - 5 ml canh thang nuôi cấy, ủ ở  $35^\circ\text{C}$  cho đến khi có được huyền dịch có độ đục tương ứng với độ đục của McFarland 0,5 (thường sau 2 - 6 giờ nuôi cấy). Có thể dùng nước muối sinh lý để hiệu chỉnh độ đục của canh khuẩn nuôi cấy để có được huyền dịch cần thiết.

## **c. Tiến hành**

- Chuẩn bị đủ số lượng ống canh thang Mueller-Hinton 0,5 ml theo các nồng độ kháng sinh cần thử nghiệm. Thêm một ống canh thang không cấy vi khuẩn và không có kháng sinh để làm chứng vô trùng cho môi trường và một ống canh thang cấy vi khuẩn nhưng không chứa kháng sinh để làm chứng cho sự phát triển của vi khuẩn.

- Hút 0,5 ml dung dịch kháng sinh thử nghiệm chuyển vào ống chứa 0,5 ml canh thang Mueller-Hinton, trộn đều rồi chuyển 0,5 ml hỗn dịch sang ống 0,5 ml canh thang thứ 2, trộn đều rồi tiếp tục chuyển 0,5 ml hỗn dịch sang ống 0,5 ml canh thang thứ 3. Cứ tiếp tục như vậy cho đến ống canh thang cuối cùng thì hút bỏ 0,5 ml hỗn dịch của ống cuối cùng đi. Như vậy, nồng độ kháng sinh trong các ống canh thang được pha loãng giảm dần theo bậc 2.

- Cho vào mỗi ống canh thang chứa kháng sinh 0,5 ml canh khuẩn  $10^6$  CFU/ml, một ống canh thang chỉ có 0,5 ml canh khuẩn  $10^6$  CFU/ml và một ống canh thang không bổ sung canh khuẩn. Nồng độ vi khuẩn trong mỗi ống còn  $5 \times 10^5$  CFU/ml.

## **d. Ủ ấm**

Ủ ấm tất cả các ống ở  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  trong vòng 16 - 20 giờ ở điều kiện khí trường bình thường.

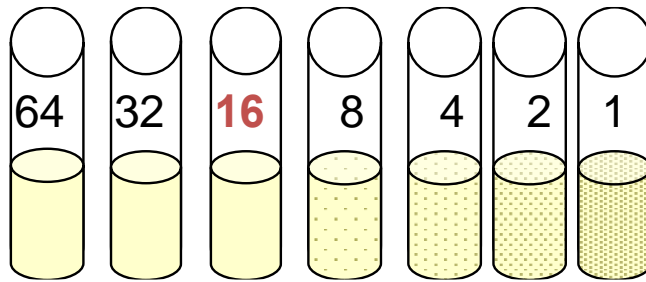
## **e. Đọc và nhận định kết quả**

Đọc giá trị MIC ở ống có nồng độ kháng sinh thấp nhất còn ức chế được sự phát triển của vi khuẩn (ống canh thang không đục) khi nhìn bằng mắt thường. Chỉ đọc kết quả khi ống chứng vi khuẩn không chứa kháng sinh thấy canh thang đục và ống chứng canh thang không chứa vi khuẩn phải trong. Khi thử nghiệm các kháng sinh



sulfonamide hoặc trimethoprim, có thể thấy vi khuẩn mọc dạng vết rất khó xác định được giá trị MIC. Trong trường hợp như vậy, sẽ đọc MIC ở ống mà vi khuẩn bị ức chế khoảng từ 80% hoặc hơn khi so sánh với ống chứng vi khuẩn. Vi khuẩn mọc có dạng vết cũng gặp ở những trường hợp kháng sinh kim khuẩn như chloramphenicol và tetracycline.

Giá trị MIC được so sánh với các giá trị breakpoint trong tài liệu CLSI hoặc EUCAST để nhận định là nhạy cảm (S), đề kháng trung gian (I) hay đề kháng (R).



Hình 1. Kết quả kháng sinh đồ pha loãng (MIC = 16 µg/mL)

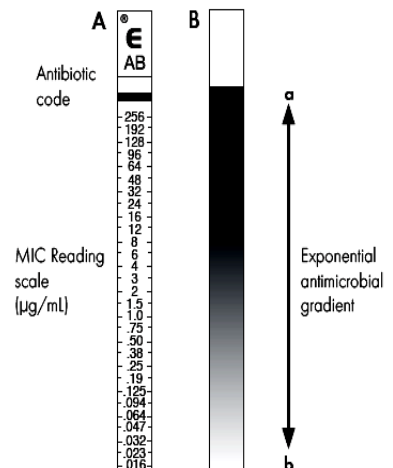
**Kỹ thuật kháng sinh đồ pha loãng trong thạch:** Thay vì kháng sinh có nồng độ giảm dần bậc 2 được hoà loãng trong canh thang thì kháng sinh có nồng độ khác nhau sẽ được hoà vào trong các bình thạch khác nhau trước khi đổ đĩa môi trường. Các đĩa môi trường được chuẩn bị từ các bình thạch có nồng độ kháng sinh khác nhau sẽ chứa lượng kháng sinh khác nhau. Một lượng vi khuẩn  $10^4$  CFU/ml được cấy trên đĩa. Đĩa nuôi cấy được ủ ấm, giá trị MIC được đọc ở đĩa có nồng độ kháng sinh thấp nhất ức chế được vi khuẩn mọc (nếu có 1 hoặc 2 khuẩn lạc (khóm) được bỏ qua coi như bị ức chế hoàn toàn).

## II. ETEST

### 1. Nguyên tắc

Etest là dải plastic kích thước 5 x 57 mm được phân bố kháng sinh theo dải nồng độ (µg/mL) và có mã code tên kháng sinh. Có 15 nồng độ kháng sinh được giảm dần theo bậc 2 gắn cố định ở một mặt của dải plastic. Khi dải Etest được đặt lên mặt thạch đã dàn vi khuẩn, kháng sinh ở các bậc nồng độ nhanh chóng khuếch tán trong thạch. Sau khi nuôi cấy qua đêm, sẽ xuất hiện vùng ức chế hình elip đối xứng qua dải plastic. Giá trị MIC được xác định trực tiếp tại điểm cắt của hình elip với dải Etest.

Hình 2: Dải Etest



## **2. Vật liệu/ trang thiết bị**

### **a. Vật liệu**

- Thạch đĩa Muller Hinton
- Nước muối sinh lý vô trùng
- Dải Etest
- Chủng vi khuẩn thuần, mới 16-24 giờ.

### **b. Dụng cụ**

- Panh kẹp, kéo
- Đèn cồn
- Que cấy
- Que tẩm bông (que gòn) vô trùng

### **c. Thiết bị**

- Máy lắc
- Tủ ấm
- Máy đo độ đục hoặc ống Mc Faland 0,5

## **3. Quy trình**

### **a. Các bước chuẩn bị**

- Chuẩn bị thạch: Chọn thạch thích hợp cho từng loài vi khuẩn (Muller-Hinton, Muller-Hinton máu...), đảm bảo chất lượng và độ dày (4,0 +/- 0,5 mm).

- Chuẩn bị kháng sinh: Các kháng sinh thử nghiệm phải được đặt ở nhiệt độ phòng (18 - 22°C) trong 30 phút nếu lưu giữ ở 4°C hoặc 60 phút nếu lưu giữ ở -20°C.

- Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn: Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm phải thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 18-24 giờ).

- Chuẩn bị huyền dịch trực tiếp từ khuẩn lạc (khóm): Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ 3-5 khuẩn lạc (khóm) có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống nước muối sinh lý 5 ml, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất có độ đục bằng độ đục của ống McFarland 0,5. Pha loãng tiếp 100 lần để có ống canh khuẩn có nồng độ  $10^6$  CFU/ml. Huyền dịch vi khuẩn sau khi pha, phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút.

- Chuẩn bị huyền dịch từ canh khuẩn nuôi cấy: Có thể sử dụng canh khuẩn nuôi cấy để chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn. Trong một số trường hợp như khuẩn lạc (khóm) khó hoà tan để có huyền dịch đồng nhất hay khi không có ngay khuẩn lạc (khóm) mới cấy 24 giờ thì phương pháp này được lựa chọn thực hiện. Nhặt ít nhất 3 - 5 khuẩn lạc (khóm) chuyển vào 4 - 5 ml canh thang nuôi cấy, ủ ở 35°C cho đến khi có được huyền

dịch có độ đục tương ứng với độ đục của McFarland 0,5 (thường sau 2 - 6 giờ nuôi cấy). Có thể dùng nước muối sinh lý để hiệu chỉnh độ đục của canh khuẩn nuôi cấy để có được huyền dịch cần thiết.

### **b. Các bước tiến hành**

- Dùng tăm bông (que gòn) vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn tăm bông (que gòn) trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt phần huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông (que gòn). Sau đó, ria đều que tăm bông (que gòn) trên toàn bộ mặt đĩa thạch Mueller-Hinton, xoay đều đĩa thạch theo góc 60° rồi ria đều que tăm bông (que gòn). Cứ tiếp tục xoay đĩa một góc 60° và ria que tăm bông (que gòn) để sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt đĩa thạch. Cuối cùng, ria tăm bông (que gòn) vòng quanh bờ mép của mặt thạch. Đóng nắp đĩa thạch và để đĩa thạch sau ria cấy vài phút ở nhiệt độ phòng cho mặt thạch se lại. Có thể dùng máy ria vi khuẩn để dàn đều canh khuẩn lên mặt thạch.

- Để mặt thạch se hoàn toàn trước khi đặt dải Etest.

- Đặt dải Etest lên mặt thạch sao cho mặt có ghi dải nồng độ hướng lên trên và phải đảm bảo toàn bộ bề mặt của dải Etest được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch.

- Khi đã đặt xong dải Etest không được dịch chuyển dải Etest khỏi vị trí.

- Ủ ấm đĩa ở  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  trong vòng 16 - 20 giờ ở điều kiện khí trường bình hoặc khí trường có bổ sung CO<sub>2</sub> nếu chủng vi khuẩn là *H. influenzae*, *Streptococci*, *Neisseria*.

6 dải Etest đặt trên đĩa 150mm, 2 dải Etest đặt trên đĩa 90mm



**Hình 3:** Cách đặt các dải Etest trên các đĩa môi trường

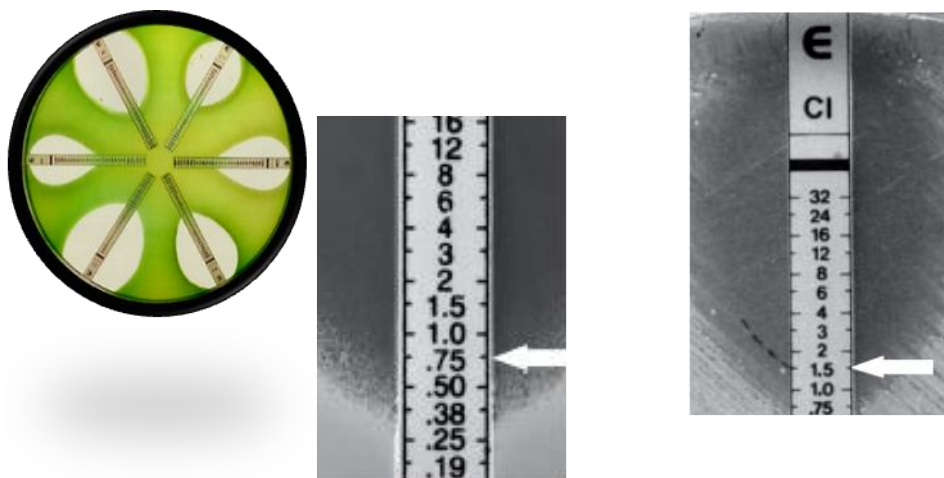
### **c. Đọc kết quả**

- Sau ủ ấm 16 - 24 giờ và khi thấy rõ vi khuẩn mọc, đọc giá trị MIC ở điểm cắt của hình elip với dải Etest. Không đọc kết quả khi bị lẫn hai hay nhiều chủng vi khuẩn, khi vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.

- Làm tròn giá trị MIC ở điểm giữa hai bậc pha loãng lên giá trị cao hơn trước khi phiên giải kết quả.

- Phiên giải kết quả MIC ra giá trị S, I hoặc R theo hướng dẫn của CLSI cập nhật hàng năm.

- Với các kháng sinh diệt khuẩn, phải đọc giá trị MIC tại điểm vi khuẩn bị ức chế hoàn toàn. Đặc biệt chú ý khi đọc với chủng *Pneumococci*, *Streptococci*, *Enterococci*, *Acinetobacter* và *Stenotrophomonas* spp. Với các kháng sinh kim khuẩn, phải đọc giá trị MIC tại điểm vi khuẩn bị ức chế 80%.



**Hình 4:** Kết quả thử nghiệm bằng Etest (MIC ở hình giữa là 0,75µg/mL, ở hình phải là 1,5 µg/mL)

### III. KHÁNG SINH ĐỒ BẰNG HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG

Nguyên lý của kháng sinh đồ trên hệ thống tự động cũng giống như nguyên lý của kỹ thuật kháng sinh đồ pha loãng trong canh thang. Thay vì phải đọc bằng mắt thường xem sự phát triển của vi khuẩn có hay không có trong môi trường để xác định giá trị MIC, hệ thống tự động sẽ đo độ đục của canh khuẩn hoặc đo tín hiệu huỳnh quang biến đổi có trong môi trường nuôi cấy để xác định giá trị MIC. Hệ thống tự động còn có thể có thêm phần mềm hỗ trợ phiên giải kết quả và có thể rút ngắn thời gian thực hiện kháng sinh đồ xuống còn 5 -15 giờ tùy theo từng loài vi khuẩn. Hơn nữa, hệ thống tự động có thể kết nối với phần mềm quản lý của phòng xét nghiệm để chuyển trực tiếp kết quả từ hệ thống tự động sang hệ thống phần mềm quản lý. Hiện nay, có 4 hệ thống tự động có thể làm kháng sinh đồ là hệ thống BD Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, Md.), MicroScan WalkAway SI (Siemens Healthcare Diagnostics, Sacramento, Calif.), TTEK Sensititre (ARIS 2X, TREK Diagnostic Systems) và Vitek 2 Compact (Biomérieux, Vitek, Hazelwood, Mo.).

Tuy nhiên, số lượng kháng sinh, số loại kháng sinh, dải nồng độ kháng sinh pha loãng là cố định trong các sản phẩm của hệ thống tự động nên không phải luôn đáp ứng được với yêu cầu sử dụng của mỗi phòng xét nghiệm.



**Hình 5.** Các hệ thống tự động làm kháng sinh đồ

Mỗi kỹ thuật kháng sinh đồ có ưu, nhược điểm riêng. Phòng xét nghiệm có thể tự lựa chọn một hay nhiều kỹ thuật nào phù hợp với yêu cầu của phòng xét nghiệm. Kỹ thuật khoan giấy khuếch tán rất linh hoạt trong việc chọn lựa kháng sinh đắt và rẻ. Hệ thống tự động thường bị giới hạn bởi số lượng và số loại kháng sinh cũng như nồng độ pha loãng kháng sinh nên không phải lúc nào cũng thích hợp với yêu cầu của phòng xét nghiệm nhưng lại có sự hỗ trợ phiên giải kết quả nên đặc biệt tốt cho các phòng xét nghiệm thiếu kinh nghiệm kiểm duyệt kết quả. Hệ thống tự động cho kết quả sớm hơn và có thể lưu trữ, phân tích và kết nối dữ liệu hệ thống. Hệ thống tự động cũng có lúc có vấn đề trục trặc xảy ra nên cần kết hợp hoặc có sẵn các kỹ thuật kháng sinh đồ khoan giấy khuếch tán hay kháng sinh đồ pha loãng để luôn đảm bảo kết quả trả kịp thời cho bệnh nhân. Cho dù dùng kỹ thuật gì thì một điều hết sức quan trọng với các bác sĩ vi sinh là phải xem xét cẩn thận và kỹ lưỡng kết quả kháng sinh đồ trước khi trả cho bác sĩ lâm sàng.

# HƯỚNG DẪN LỰA CHỌN KHÁNG SINH THỬ NGHIỆM VÀ PHIÊN GIẢI KẾT QUẢ KHÁNG SINH ĐỒ

## 1. Cơ sở lựa chọn kháng sinh thử nghiệm

Việc lựa chọn các loại kháng sinh thích hợp nhất cho thử nghiệm và báo cáo kết quả kháng sinh đồ tốt nhất được dựa trên sự phối hợp giữa phòng xét nghiệm cùng sự tham vấn của các bác sĩ truyền nhiễm, với Khoa dược, Hội đồng thuốc và điều trị và Hội đồng kiểm soát nhiễm khuẩn của bệnh viện. Tất cả các khuyến cáo thử nghiệm các kháng sinh cho từng nhóm vi khuẩn đã được minh chứng hiệu quả trong phòng xét nghiệm. Tuy nhiên, lựa chọn kháng sinh nào cho thử nghiệm và báo cáo kết quả còn được cân nhắc dựa trên tính hiệu quả trên lâm sàng của thuốc, tỷ lệ đề kháng thuốc của vi khuẩn, việc giảm thiểu tối đa sự xuất hiện các chủng kháng thuốc, chi phí và các chỉ định lâm sàng của thuốc được FDA công nhận và những hướng dẫn mới nhất về các nhóm thuốc lựa chọn hàng đầu và nhóm thuốc thay thế cho điều trị. Lựa chọn các loại thuốc kháng sinh cho thử nghiệm có thể sử dụng cho mục đích chống nhiễm khuẩn.

Các kháng sinh khi được xếp trong cùng một ô thì có kết quả phiên giải và hiệu quả lâm sàng tương tự nhau. Trong ô đó, các kháng sinh được nối với nhau bằng từ “hoặc” có nghĩa là các kháng sinh này có hiện tượng đề kháng chéo và nhạy cảm chéo. Do đó, kết quả thử nghiệm của một kháng sinh có thể sử dụng để phiên giải cho các kháng sinh khác.

## 2. Các nhóm kháng sinh thường sử dụng

Các thuốc kháng sinh được chia thành các nhóm như sau:

### a. $\beta$ -Lactams

Các kháng sinh thuộc nhóm  $\beta$ -lactams có chung đặc điểm về cấu trúc vòng 4 cạnh và tác dụng ức chế sự tổng hợp vách tế bào. Khi gắn thêm các cấu trúc dạng vòng hoặc các nhóm thế khác nhau vào vòng  $\beta$ -lactams sẽ tạo ra kháng sinh nhóm penicillin, cephem, carbapenem hoặc monobactam.

#### *Penicillins*

Penicillins là nhóm kháng sinh có tác dụng đối với vi khuẩn Gram dương hiếu khí không sinh  $\beta$ -lactamase, vi khuẩn gram âm và cả một số vi khuẩn kỵ khí.

- Phân nhóm aminopenicillins (ampicillin và amoxicillin) có thêm hoạt tính trên các vi khuẩn Gram âm bao gồm một số thành viên của *Enterobacteriaceae* như *E. coli* và *P. mirabilis*.

- Carboxypenicillins (carbenicillin và ticarcillin) và ureidopenicillins (mezlocillin và piperacillin) có tác dụng với khá nhiều vi khuẩn gram âm bao gồm cả vi khuẩn *Pseudomonas* và *Burkholderia* spp.

- Các penicillin bền vững với penicillinase có hoạt tính chủ yếu trên các vi khuẩn Gram dương.

#### *$\beta$ -lactams phối hợp với chất ức chế $\beta$ -lactamase*

Những kháng sinh thuộc nhóm này là các kháng sinh phối hợp giữa một kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam và một hoạt chất có tác dụng kháng khuẩn yếu nhưng có chức năng chính là ức chế một số  $\beta$ -lactamases. Hiện nay, 4 chất ức chế  $\beta$ -lactamase được sử dụng là: acid clavulanic, sulbactam, tazobactam và avibactam. Kết quả thử nghiệm đơn chất  $\beta$ -lactam đối với các vi khuẩn sinh  $\beta$ -lactamase không có ý nghĩa dự đoán tính nhạy cảm của hợp chất phối hợp kháng sinh đó với chất ức chế  $\beta$ -lactamase.

#### *Cephems*

Trong nhóm này, các kháng sinh khác nhau có phổ tác dụng khác nhau đối với vi khuẩn gram âm/gram dương, vi khuẩn hiếu khí/ky khí. Nhóm cephem bao gồm các cephalosporins, cephamycin, oxacephem và carbacephems. Cephalosporins được chia thành 4 thế hệ I, II, III và IV dựa trên sự mở rộng thêm phổ tác dụng với các vi khuẩn gram âm hiếu khí để kháng kháng sinh. Các kháng sinh thuộc cùng một thế hệ cũng có thể có phổ tác dụng không giống nhau. Do đó, có thể có nhiều kháng sinh thuộc cùng nhóm cùng được lựa chọn cho thử nghiệm kháng sinh đồ thường qui.

#### *Penems*

Nhóm penem bao gồm 2 phân nhóm, carbapenem và penems, cấu trúc có sự khác biệt nhỏ so với nhóm penicillin. Các kháng sinh thuộc nhóm này có khả năng kháng lại  $\beta$ -lactamase cao hơn, do đó có phổ tác dụng rộng hơn đối với nhiều loại vi khuẩn gram dương và vi khuẩn gram âm.

#### *Monobactams*

Các kháng sinh nhóm này là  $\beta$ -lactams đơn vòng. Hiện nay, aztreonam (chỉ có tác dụng kháng khuẩn đối với vi khuẩn gram âm hiếu khí) là kháng sinh monobactam duy nhất được FDA phê duyệt.

#### *Glycopeptides*

Kháng sinh nhóm này bao gồm vancomycin và teicoplanin, có cấu trúc hóa học phức tạp và có tác dụng ức chế sự tổng hợp vách tế bào ở đích tác động khác so với nhóm  $\beta$ -lactams. Kháng sinh nhóm này có tác dụng với vi khuẩn gram dương hiếu khí. Vancomycin là kháng sinh được dùng để điều trị nhiễm khuẩn gram dương trên bệnh nhân dị ứng penicillin, và nhiễm trùng do các chủng vi khuẩn gram dương kháng  $\beta$ -lactams (MRSA và một số enterococci).

### **b. Aminoglycosides**

Kháng sinh nhóm này có hoạt tính ức chế sinh tổng hợp protein của vi khuẩn ở mức độ ribosome. Các aminoglycoside bị đề kháng do vi khuẩn sinh các enzym khác nhau bất hoạt kháng sinh nên có sự khác nhau về phổ tác dụng giữa các kháng sinh khác nhau. Nhóm này được sử dụng trong điều trị các trực khuẩn gram âm hiếu khí hoặc phối

hợp hiệp đồng tác dụng với một số kháng sinh có tác dụng lên vách tế bào vi khuẩn (penicillin, ampicillin, vancomycin) chống lại một số vi khuẩn gram dương đề kháng kháng sinh như enterococci.

### **c. Macrolides**

Cơ chế tác dụng của các kháng sinh thuộc nhóm macrolides là ức chế sinh tổng hợp protein của tế bào vi khuẩn ở mức độ ribosome. Một số kháng sinh trong nhóm này gần đây đang được sử dụng để điều trị các chủng vi khuẩn gram âm dễ nuôi cấy. Với các vi khuẩn gram dương, chỉ có erythromycin được thử nghiệm kháng sinh đồ thường qui.

### **d. Tetracyclines**

Kháng sinh nhóm này cũng có cơ chế tác dụng là ức chế sinh tổng hợp protein ở mức độ ribosome của một số vi khuẩn gram dương và vi khuẩn gram âm. Các kháng sinh trong nhóm có tính tương đồng về phổ tác dụng, sự khác biệt về phổ tác dụng là rất ít nên chỉ có tetracycline là cần được thử nghiệm thường qui. Các vi khuẩn nhạy cảm với tetracycline thì cũng nhạy cảm với doxycycline và minocycline. Tuy nhiên, một số vi khuẩn đề kháng hoặc kháng trung gian với tetracycline thì vẫn có thể nhạy cảm với doxycycline và/hoặc minocycline.

### **e. Quinolones**

Kháng sinh nhóm quinolones (quinolones và fluoroquinolones) có cơ chế tác dụng là ức chế hoạt tính của DNA-gyrase hoặc topoisomerase của nhiều loại vi khuẩn gram dương và gram âm. Các kháng sinh trong nhóm có phổ tác dụng khác nhau, do đó cần thử nghiệm đối với từng kháng sinh riêng biệt.

### **f. Các chất ức chế trong con đường chuyển hóa Folate**

Sulfonamides và trimethoprim là những kháng sinh có phổ tác dụng tương đồng và cùng ức chế con đường chuyển hóa folate của vi khuẩn. Sulfamethoxazole thường được phối hợp với trimethoprim, bởi vì hai kháng sinh này có tác dụng ức chế các bước nối tiếp trong con đường chuyển hóa folate của một số vi khuẩn gram dương và vi khuẩn gram âm.

### **g. Lipopeptides**

Kháng sinh nhóm này tác động lên màng bào tương của tế bào vi khuẩn. Phân nhóm polymyxin, gồm có polymyxin B và colistin có hoạt tính với vi khuẩn gram âm. Daptomycin là một lipopeptide vòng có tác dụng với vi khuẩn gram dương. Hoạt tính của các kháng sinh nhóm lipopeptides bị ảnh hưởng mạnh bởi sự có mặt của các cation hóa trị 2 trong môi trường thử nghiệm. Sự có mặt quá nhiều calci sẽ ức chế hoạt động của polymyxin nhưng ngược lại khi nồng độ calci ở mức 50mg/L (ngưỡng sinh lý) lại là cần thiết cho hoạt tính của daptomycin.

### **h. Các nhóm thuốc đơn chất**

Các kháng sinh sau đây thường là kháng sinh duy nhất trong một nhóm kháng sinh được sử dụng trong điều trị cho người đồng thời cũng thích hợp cho thử nghiệm *in vitro*. Đó là chloramphenicol (phenicols), clindamycin (lincosamides) - các kháng sinh



có tác dụng ức chế sự tổng hợp protein; rifampin (ansamycins) - kháng sinh ức chế tổng hợp RNA; nitrofurantoin (nitrofurans) - ức chế sinh tổng hợp protein, chỉ được sử dụng để điều trị nhiễm khuẩn tiết niệu; fosfomycin (fosfomycins) - ức chế enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp vách cũng được phê duyệt bởi FDA trong điều trị viêm đường tiết niệu.

### 3. Các kháng sinh chia theo nhóm thử nghiệm và báo cáo

Các kháng sinh được chia thành các nhóm A, B, C, U, O và Inv cho mục đích lựa chọn thử nghiệm và lựa chọn báo cáo.

**Nhóm A** gồm các kháng sinh thích hợp cho cả thử nghiệm thường qui, thử nghiệm ưu tiên và báo cáo thường qui các kết quả đối với từng nhóm vi khuẩn.

**Nhóm B** gồm các kháng sinh có thể thử nghiệm cùng với các kháng sinh nhóm A nhưng báo cáo các kết quả được thực hiện một cách chọn lọc cho từng trường hợp cụ thể. Ví dụ như khi vi khuẩn đề kháng các kháng sinh cùng loại trong nhóm A, cần báo cáo kết quả kháng sinh thuộc nhóm B. Các tiêu chí khác có thể cần nhắc khi báo cáo bao gồm nguồn gốc bệnh phẩm (ví dụ cephalosporins thế hệ 3 dùng cho trực khuẩn đường ruột phân lập từ dịch não tủy hoặc trimethoprim-sulfamethoxazole dùng cho các vi khuẩn phân lập từ nước tiểu), tình trạng đa nhiễm khuẩn, nhiễm trùng ở nhiều vị trí, các trường hợp bệnh nhân bị dị ứng thuốc, không dung nạp thuốc, không đáp ứng với các kháng sinh trong nhóm A hoặc dùng cho mục đích chống nhiễm khuẩn.

**Nhóm C** bao gồm các kháng sinh thay thế hoặc bổ sung có thể cần thử nghiệm tại các cơ sở có tồn tại các chủng gây dịch đề kháng với các kháng sinh ưu tiên thử nghiệm hoặc dùng trong điều trị đối với các bệnh nhân có tiền sử đề kháng một số thuốc được ưu tiên lựa chọn cho điều trị ban đầu, hoặc điều trị các vi khuẩn bất thường (ví dụ, chloramphenicol dùng cho *Salmonella* spp., phân lập ngoài ruột) hoặc như là một công cụ hỗ trợ dịch tễ học cho công tác kiểm soát nhiễm khuẩn.

**Nhóm U** (ví dụ nitrofurantoin và các quinolone) thường chỉ dùng trong điều trị nhiễm trùng tiết niệu. Các kháng sinh này thường không được báo cáo thường qui cho các căn nguyên nhiễm trùng phân lập được ở các ổ nhiễm trùng khác. Các kháng sinh khác có chỉ định rộng hơn có thể được bao gồm trong nhóm U trong điều trị các tác nhân gây viêm tiết niệu (ví dụ, *Pseudomonas aeruginosa*).

**Nhóm O** (“other” - khác) gồm các kháng sinh có tác dụng lâm sàng đối với một nhóm vi khuẩn, nhưng thường không phải là lựa chọn cho thử nghiệm thường qui.

**Nhóm Inv** (“Investigational” - nghiên cứu) gồm các kháng sinh đang trong quá trình nghiên cứu, chưa được FDA thông qua sử dụng ở Mỹ.

### 4. Lựa chọn kháng sinh báo cáo

Mỗi phòng xét nghiệm nên quyết định lựa chọn kháng sinh nào trong bảng 1A và 1B cho báo cáo thường qui (nhóm A), kháng sinh nào chỉ được lựa chọn cho báo cáo chọn lọc (nhóm B), đồng thời nên tham khảo tư vấn của các nhà lâm sàng, các dược sỹ,

hội đồng chống nhiễm khuẩn, hội đồng thuốc và điều trị và dược lâm sàng của bệnh viện. Các báo cáo nhằm hỗ trợ cải thiện hiệu quả điều trị trên lâm sàng và giảm thiểu được sự phát triển của các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc do sự lạm dụng kháng sinh phổ rộng. Kết quả báo cáo với các kháng sinh trong nhóm B không có trong báo cáo thường qui nhưng luôn cần có sẵn trong trường hợp cần thiết, đối với một số bệnh phẩm. Cần báo cáo khi phát hiện sự kháng thuốc mới.

## 5. Khuyến cáo danh mục kháng sinh nên thử nghiệm và báo cáo

**Bảng 1A:** Các kháng sinh được FDA khuyến cáo thử nghiệm cho các vi khuẩn dễ nuôi cấy

	<i>Enterobacteriaceae</i> e <sup>e</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp. <sup>k</sup>
NHÓM A Các kháng sinh cần thử nghiệm và báo cáo	Ampicillin <sup>e</sup>	Ceftazidime	Azithromycin <sup>c</sup> hoặc clarithromycin <sup>c</sup> hoặc erythromycin <sup>c</sup>	Ampicillin  Penicillin <sup>l</sup>
			Clindamycin <sup>c</sup>	
			Oxacillin (cefoxitin) <sup>h,i</sup>	
	Cefazolin <sup>f</sup>	Gentamicin Tobramycin	Penicillin <sup>h</sup>	
	Gentamicin Tobramycin	Piperacillin- tazobactam	Trimethoprim- sulfamethazole	
NHÓM B Các kháng sinh cần thử nghiệm và chọn lọc báo cáo	Amikacin	Amikacin	Daptomycin	Daptomycin
		Aztreonam	Linezolid	Lizolid
	Amoxicillin- clavulanic acid Ampicillin- sulbactam Piperacillin- tazobactam Ticarcillin-clavulanic acid	Cefepime	Telithromycin <sup>c</sup>	Lizolid
			Doxycycline Minocycline Tetracycline <sup>a</sup>	

	<i>Enterobacteriaceae</i> e <sup>e</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp. <sup>k</sup>	
	Cefuroxime	Ciprofloxacin Levofloxacin	Vancomycin	Vancomycin	
	Cefepime	Imipenem Meropenem			
	Cefotetan Cefoxitin	Piperacillin- tazobactam  Ticarcillin			
	Cefotaxime <sup>e,f</sup> hoặc Ceftriaxone <sup>e,f</sup>				
	Ciprofloxacin <sup>e</sup> Levofloxacin <sup>e</sup>				
	Ertapenem Imipenem Meropenem				
	Piperacillin				
	Trimethoprim- sulfamethazole <sup>e</sup>				
<b>NHÓM C</b> Các kháng sinh chọn lọc báo cáo bổ sung	Aztreonam Ceftazidime			Chloramphenicol <sup>c</sup>	Gentamicin H
				Ciprofloxacin hoặc levofloxacin hoặc ofloxacin	
			Moxifloxacin		
	Chloramphenicol <sup>c,e</sup>		Gentamicin		
	Tetracyclin <sup>a</sup>				
<b>NHÓM U</b> Các kháng sinh bổ sung chỉ cho chúng phân lập từ nước tiểu	Cephalothin	Ofloxacin	Norfloxacin	Ciprofloxacin Levofloxacin Nofloxacin	
	Ofloxacin Norfloxacin	Norfloxacin			
	Nitrofurantoin		Nitrofurantoin	Nitrofurantoin	
	Sulfisoxazole		Sulfisoxazole		
	Trimethoprim		Trimethoprim	Tetracyclin <sup>a</sup>	

	<i>Enterobacteriaceae</i> <sup>e</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp. <sup>k</sup>
	<i>Acinetobacter</i> spp. <sup>g</sup>	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>g</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <sup>g</sup>	Các <i>Non-Enterobacteriaceae</i> khác <sup>g</sup>
NHÓM A Các kháng sinh cần thử nghiệm và báo cáo	Ampicillin-sulbactam	Levofloxacin	Trimethoprim-sulamethoxazole	Ceftazidime
	Ceftazidime	Meropenem		
	Ciprofloxacin Levofloxacin	Trimethoprim-sulamethoxazole		
	Doripenem Imipenem Meropenem			Gentamicin Tobramycin
	Gentamicin Tobramycin			
NHÓM B <sup>e</sup> Các kháng sinh cần thử nghiệm và chọn lọc báo cáo	Amikacin	Ceftazidime	*Ceftazidime	Amikacin
			Levofloxacin	Aztreonam
			Minocycline	Cefepime
	Piperacillin-tazobactam			Ciprofloxacin Levofloxacin
		Minocycline	*Ticarcillin-clavulanic acid	Imipenem Meropenem
				Piperacillin-tazobactam
				Trimethoprim-sulamethoxazole
	Cefepime			
	Cefotaxime Ceftriaxone			
	Doxycycline			
Minocycline				
Trimethoprim-sulfamethoxazole				

	<i>Enterobacteriaceae</i> e <sup>e</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp. <sup>k</sup>
NHÓM C <sup>f</sup> Các kháng sinh chọn lọc bảo cáo hỗ sung		Chloramphenicol <sup>c</sup>	Chloramphenicol <sup>c</sup>	Cefotaxime Ceftriaxone
				Chloramphenicol <sup>c</sup>
NHÓM U Các kháng sinh bổ sung chỉ cho chủng nhân lập từ nước tiểu	Tetracycline			Norfloxacin
				Sulfisoxazol
				Tetracycline <sup>a</sup>

\* Phải làm kháng sinh đồ định lượng xác định MIC vì kết quả khoanh giấy không đủ tin cậy.

### ***Chú thích bảng 1A:***

#### Thông tin chung:

a. Các chủng vi khuẩn nhạy cảm với tetracycline cũng nhạy cảm với doxycycline và minocycline. Tuy nhiên, một số chủng vi khuẩn đề kháng trung gian hoặc đề kháng với tetracycline có thể vẫn nhạy cảm với doxycycline, minocycline hoặc với cả hai.

b. Không nên thông báo với các chủng vi khuẩn phân lập từ nước tiểu.

#### *Enterobacteriaceae*

c. Kết quả của cephalothin nên dùng để phiên giải cả kết quả của các kháng sinh đường uống như cefadroxil, cefpodoxime, cephalixin và loracarbef.

d. Chỉ thử nghiệm ampicillin, một loại fluoroquinolone và trimethoprim/sulfamethoxazole với chủng *Salmonella* và *Shigella* phân lập từ phân. Các chủng *Salmonella* phân lập ngoài đường ruột cần thử nghiệm thêm với một kháng sinh cephalosporin thế hệ III và chloramphenicol. *Salmonella* và *Shigella* có thể có kết quả nhạy cảm với cephalosporin thế hệ I, II và aminoglycoside khi thử nghiệm nhưng không có hiệu quả điều trị trên lâm sàng nên không bao giờ trả kết quả là nhạy cảm với các nhóm kháng sinh này.

e. Cefotaxime và ceftriaxone cần thử nghiệm cho các chủng phân lập từ dịch não tủy thay cho kháng sinh cephalozin.

#### *Pseudomonas aeruginosa* và các Non-*Enterobacteriaceae* khác:

f. Các chủng non-*Enterobacteriaceae* bao gồm cả các chủng *Pseudomonas* và các trực khuẩn Gram âm để nuôi cấy không lên men glucose mà không bao gồm *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. *B. cepacia* và *S. maltophilia* vì những chủng vi khuẩn này có hướng dẫn riêng.

### Staphylococcus spp.:

g. Chủng staphylococci nhạy với penicillin cũng sẽ nhạy với các penicillin khác, các  $\beta$ -lactam phối hợp với kháng  $\beta$ -lactamase, cepheims kháng tụ cầu và các carbapenem được FDA chấp thuận cho điều trị các nhiễm khuẩn do tụ cầu. Các chủng kháng penicillin nhưng nhạy với oxacillin sẽ kháng với các penicillin bị thủy phân bởi penicillinase nhưng nhạy cảm với các penicillin bền vững với penicillinase, các  $\beta$ -lactam phối hợp với kháng  $\beta$ -lactamase, cepheims kháng tụ cầu và các carbapenem. Các chủng *S. aureus* kháng oxacillin (MRSA) sẽ kháng với tất cả các  $\beta$ -lactam hiện có, chỉ trừ các cephalosporin mới có hoạt tính kháng MRSA.

h. Kết quả cefoxitin có thể dự đoán được sự đề kháng oxacillin do gen *mecA* ở *S. aureus* và *S. lugdunensis*. Các tụ cầu coagulase âm ngoại trừ *S. lugdunensis*, khoan giấy cefoxitin nên sử dụng để phát hiện đề kháng oxacillin qua trung gian gen *mecA*. Nếu thử nghiệm một kháng sinh penicillin bền vững với penicillinase, nên sử dụng oxacillin và kết quả có thể phiên giải cho tất cả các kháng sinh penicillin bền vững với penicillinase, cloxacillin, dicloxacillin và flucloxacillin.

i. Thông báo cho các chủng *S. aureus* nhạy cảm với methicillin.

### Enterococcus spp.

Với các *Enterococcus* spp., cephalosporins, aminoglycoside (ngoại trừ nồng độ cao), clindamycin, và SXT có thể thử nghiệm invitro cho kết quả nhạy cảm nhưng không có hiệu quả điều trị trên lâm sàng nên không trả lời là nhạy cảm.

Enterococci nhạy cảm với penicillin cũng nhạy cảm với ampicillin, amoxicillin, ampicillin-sulbactam, amoxicillin -clavulanat, piperacillin, và piperacillin-tazobactam cho các chủng enterococci không sinh  $\beta$ -lactamase. Tuy nhiên, enterococci nhạy cảm với ampicillin không thể trả lời cũng nhạy cảm với penicillin. Phối hợp thuốc ampicillin, penicillin hoặc vancomycin với một aminoglycoside thường được sử dụng cho các nhiễm trùng nặng như viêm nội tâm mạc.

### **Lưu ý:**

- Không nên thông báo kết quả kháng sinh đồ của các kháng sinh dưới đây cho các chủng vi khuẩn phân lập từ dịch não tủy vì các kháng sinh này có thể không có hiệu quả điều trị nhiễm trùng dịch não tủy:

- + Các kháng sinh chỉ dùng đường uống
- + Cephalosporins thế hệ 1, 2 (ngoại trừ cefuroxime đường tiêm)
- + Các cephamycins
- + Macrolides
- + Tetracyclines
- + Fluoroquinolones

- Không thử nghiệm các kháng sinh cho các chi/loài vi khuẩn có đặc tính đề kháng tự nhiên.

Bảng đề kháng tự nhiên của *Enterobacteriaceae* với các kháng sinh

Kháng sinh Vi khuẩn	Ampicillin	Amoxicillin-Clavulanate	Ampicillin-Sulbactam	Piperacillin	Ticarcillin	Cephalosporin I: Cefazolin, Cephalothin	Cephameycin: Cefoxitin, Cefotetan	Cephalosporin II: Cefuroxime	Tetracyclines	Nitrofurantoin	Polymyxin B, Colistin
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R			R	R	R			
<i>Citrobacter koseri</i>	R	R	R	R	R						
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R			R	R	R			
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R			R	R	R			
<i>Escherichia coli</i>	Không có sự đề kháng tự nhiên với các kháng sinh $\beta$ -lactam										
<i>Escherichia hermannii</i>	R				R						
<i>Hafnia alvei</i>	R	R	R			R	R				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R				R						
<i>Morganella morganii</i>	R	R				R		R	R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	Không có sự đề kháng tự nhiên với các kháng sinh $\beta$ -lactam								R	R	R
<i>Proteus penneri</i>	R					R		R	R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R					R		R	R	R	R
<i>Providencia rettgeri</i>	R	R				R			R	R	R
<i>Providencia stuartii</i>	R	R				R			R	R	R
<i>Salmonella, Shigella spp.</i>	Không có sự đề kháng tự nhiên với các kháng sinh $\beta$ -lactam										
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R			R	R	R		R	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R			R	R					

Không có sự đề kháng tự nhiên của *Enterobacteriaceae* với Cephalosporin III, cefepime, aztreonam, ticarcillin-clavulanic, piperacillin-tazabactam và các carbapenem.

R: đề kháng

Bảng đề kháng tự nhiên của *non-Enterobacteriaceae* với các kháng sinh

Vi khuẩn Kháng sinh	<b>Acinetobacter baumannii/ Acinetobacter calcoaceticus complex</b>	<b>Burkholderia cepacia complex</b>	<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	<b>Stenothzophomonas maltophilia</b>
Ampicillin, Amoxicillin	R	R	R	R
Piperacillin		R		R
Ticarcillin		R		R
Ampicillin-Sulbactam		R	R	R
Amoxicillin- Clavulanate	R	R	R	R
piperacillin Tazobactam	-	R		R
Cefotaxime		R	R	R
Ceftriaxone		R	R	R
Ceftazidime				
Cefepime		R		
Aztreonam	R	R		R
Imipenem		R		R
Meropenem				R
Ertapenem	R	R	R	R
Polymyxin B Colistin		R		
Aminoglycosides		R		R
Tetracyclines/Tigecycline			R	
Trimethoprim	R	R	R	R
Trimethoprim- sulfamethoxazole			R	
Chloramphenicol			R	
Fosfomycin	R	R		R

R: đề kháng



**Bảng 1B:** Các kháng sinh được FDA khuyến cáo thử nghiệm cho các loài vi khuẩn khó nuôi cấy

	<i>Haemophilus influenzae</i> và <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <sup>d</sup>	<i>Neisseria gonorrhoea</i> <sup>e</sup>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <sup>i</sup>	<i>Streptococcus</i> spp. tan máu $\beta^p$	<i>Streptococcus</i> spp. nhóm viridans <sup>p</sup>
NHÓM A Các kháng sinh cần thử nghiệm và báo cáo	Ampicillin <sup>d,f</sup>	Ceftriaxone	Erythromycin <sup>c,o</sup>	Clindamycin	*Ampicillin <sup>m</sup>  *Penicillin <sup>m</sup>
		Cefixime			
		Ciprofloxacin	Erythromycin <sup>c,a,o</sup>		
	Trimethoprim-sulfamethaxazole	Tetracycline	Penicillin <sup>k</sup> (oxacillin khoanh)		
			Trimethoprim-sulfamethaxazole	Penicillin <sup>n</sup> hoặc ampicillin <sup>n</sup>	
NHÓM B Các kháng sinh cần thử nghiệm và chọn lọc báo cáo	Ampicillin-sulbactam		*Cefepime *Cefotaxime <sup>k</sup> *Ceftriaxone <sup>k</sup>	Cefepime hoặc Cefotaxime hoặc Ceftriaxone	Cefepime Cefotaxime Ceftriaxone
	Cefuroxime (đường tiêm)		Clindamycin <sup>c</sup>		
	Cefuroxime <sup>d</sup> hoặc Ceftazidime hoặc Ceftriaxone <sup>d</sup>		Levofloxacin <sup>i</sup> Moxifloxacin <sup>i</sup> Gemifloxacin <sup>j</sup>	Vancomycin	Vancomycin
	Chloramphenicol <sup>c,d</sup>		*Meropenem		
	Meropenem <sup>d</sup>		Tetracycline <sup>b</sup>		
			Vancomycin <sup>k</sup>		

	<i>Haemophilus influenzae</i> và <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <sup>d</sup>	<i>Neisseria gonorrhoea</i> <sup>e</sup>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <sup>j</sup>	<i>Streptococcus</i> spp. tan máu $\beta^p$	<i>Streptococcus</i> spp. nhóm viridans <sup>p</sup>
<b>NHÓM C</b> Các kháng sinh chọn lọc báo cáo bổ sung	Azithromycin <sup>e</sup> Clarithromycin <sup>e</sup>		*Amoxicillin * Amoxicillin-clavulanic acid	Ceftaroline	Chloramphenicol <sup>c</sup>
	Aztreonam			Chloramphenicol <sup>c</sup>	Clindamycin <sup>c</sup>
	Amoxicillin-clavulanic acid <sup>e</sup>	Cefotaxime hoặc Ceftriaxone	*Cefuroxime	Daptomycin	Erythromycin <sup>a,c</sup>
	Cefuroxime (đường uống) <sup>e</sup>	Cefoxitin Cefuroxime	Ceftaroline	Levofloxacin	
	Ceftaroline <sup>g</sup>	Ciprofloxacin hoặc ofloxacin	Chloramphenicol <sup>c</sup>	Linezolid	Linezolid
	Ciprofloxacin hoặc levofloxacin hoặc moxifloxacin Gemifloxacin	Penicillin <sup>h</sup>	*Ertapenem *Imipenem		
	Ertapenem hoặc imipenem		Linezolid		
	Rifampin <sup>h</sup>				
	Tetracyclin <sup>a</sup>	Tetracyclin <sup>b</sup>	Rifampin <sup>l</sup>		

**Chú thích bảng 1B:**

Thông tin chung:

- Tính nhạy cảm và đề kháng với azithromycin và clarithromycin có thể dự báo dựa trên thử nghiệm erythromycin.
- Các chủng vi khuẩn nhạy cảm với tetracycline cũng nhạy cảm với doxycycline và minocycline.
- Không báo cáo thường qui cho các chủng phân lập từ nước tiểu.

*Haemophilus spp.:*

d. Chủng *H. influenzae* phân lập từ dịch não tủy thì chỉ trả kết quả ampicillin, một cephalosporin thế hệ 3, chloramphenicol và meropenem.

e. Amoxicillin-clavulanat, azithromycin, cefaclor, cefdinir, cefixime, cefpodoxime, ceddprozil, cefuroxime và clarithromycin là các kháng sinh đường uống có thể dùng điều trị theo kinh nghiệm cho các nhiễm trùng hô hấp do *Haemophilus spp.* Kết quả thử nghiệm kháng sinh đồ của các kháng sinh này thường không có ý nghĩa nhiều cho điều trị nhưng có ý nghĩa cho các nghiên cứu giám sát và nghiên cứu dịch tễ học.

f. Kết quả thử nghiệm của ampicillin có thể sử dụng để phiên giải cho amoxicillin. Hầu hết các chủng *H. influenzae* đề kháng với ampicillin và amoxicillin do sinh  $\beta$ -lactamase loại TEM. Trong phần lớn các trường hợp, thử nghiệm phát hiện trực tiếp  $\beta$ -lactamase có thể phát hiện sớm chủng đề kháng ampicillin và amoxicillin.

g. Cho riêng *H. influenzae*.

h. Chỉ dùng cho trường hợp dự phòng tiếp xúc.

*Neisseria gonorrhoeae:*

i. Nuôi cấy và kháng sinh đồ cho *N. gonorrhoeae* chỉ nên thực hiện khi điều trị thất bại. Các kháng sinh được khuyến cáo cho thử nghiệm tối thiểu là các kháng sinh đã được liệt kê trong nhóm A.

*Streptococcus pneumoniae:*

j. *S. pneumoniae* nhạy cảm với levofloxacin cũng nhạy cảm với gemifloxacin và moxifloxacin. Tuy nhiên, *S. pneumoniae* nhạy cảm với gemifloxacin hoặc moxifloxacin chưa chắc đã nhạy cảm với levofloxacin.

k. Penicillin và cefotaxime, ceftriaxone hoặc meropenem nên thử nghiệm kháng sinh đồ định lượng để có kết quả chính xác và nên báo cáo thường qui cho các chủng phân lập từ dịch não tủy. Những chủng phân lập ở vị trí khác có thể thử nghiệm bằng khoanh giấy oxacillin nhưng nếu đường kính vùng ức chế của oxacillin  $\leq 19$  mm thì phải xác định MIC của penicillin và cefotaxime, ceftriaxone hoặc meropenem.

l. Không nên dùng đơn độc rifampin để điều trị.

*Streptococcus spp.:*

m. Các chủng đề kháng trung gian với penicillin hoặc ampicillin có thể cần phối hợp với một aminoglycoside để có được hiệu quả diệt khuẩn.

n. Penicillin và ampicillin được lựa chọn cho điều trị các nhiễm trùng do *Streptococcus* tan máu (tan máu (tiêu huyết))  $\beta$ . Kháng sinh đồ cho các chủng *Streptococcus* tan máu (tan máu (tiêu huyết))  $\beta$  là không cần thiết thực hiện vì cực kỳ hiếm có chủng *Streptococcus* tan máu (tan máu (tiêu huyết))  $\beta$  giảm nhạy cảm với hai kháng sinh này.

o. Khuyến cáo cho điều trị dự phòng nhiễm *Streptococcus* tan máu (tan máu (tiêu huyết))  $\beta$ .

p. *Streptococcus* tan máu (tan máu (tiêu huyết))  $\beta$  bao gồm streptococci nhóm A, C, G, B

**Lưu ý:** Không nên thông báo kết quả kháng sinh đồ của các kháng sinh dưới đây cho các chủng vi khuẩn phân lập từ dịch não tủy vì các kháng sinh này có thể không có hiệu quả điều trị nhiễm trùng dịch não tủy:

- Các kháng sinh chỉ dùng đường uống
- Cephalosporin thế hệ 1, 2 (ngoại trừ cefuroxime đường tiêm)
- Các cephamycin
- Macrolides
- Tetracyclines
- Fluoroquinolones

## 6. Các lưu ý cho một số thử nghiệm riêng ở một số loài và phiên giải kết quả

### a. *Staphylococcus spp.*

- Phát hiện đề kháng methicillin:

Khi sử dụng cefoxitin làm đại diện cho oxacillin, tính nhạy cảm hay kháng oxacillin được dựa trên kết quả đối với cefoxitin.

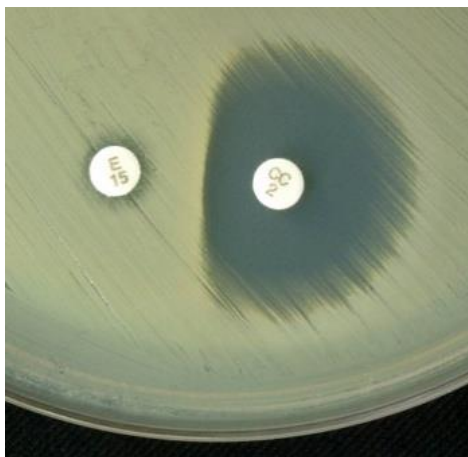
Các chủng staphylococci mang gen *mecA*, hoặc sinh PBP 2a, sản phẩm mã hoá bởi gen *mecA* sẽ đề kháng oxacillin. Các chủng không phát hiện mang gen *mecA*, hoặc sinh PBP 2a thì sẽ nhạy cảm với oxacillin. Giá trị MIC của oxacillin  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  phản ánh khả năng đề kháng oxacillin của chủng phân lập mặc dù âm tính với gen *mecA*.

MRSA và các staphylococci coagulase âm kháng methicillin nên được báo cáo kháng với tất cả các penicillin khác, carbapenems, cepheims, và kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam phối hợp một chất ức chế  $\beta$ -lactamase mà không cần tiến hành thử nghiệm với các loại kháng sinh này. Lý do là hầu hết các trường hợp nhiễm trùng chủng vi khuẩn đề kháng methicillin đều có đáp ứng rất thấp đối với liệu pháp điều trị bằng  $\beta$ -lactam.

- Phát hiện đề kháng clindamycin:

*S. aureus*, *S. pneumoniae* và streptococci tan máu (tiêu huyết)  $\beta$  có mang gen mã hoá cho khả năng đề kháng clindamycin nhưng phải có mặt của erythromycin là chất gây cảm ứng đặc tính đề kháng này được biểu hiện. Để phát hiện được chủng *S. aureus*, *S. pneumoniae* và streptococci tan máu (tiêu huyết)  $\beta$  có khả năng đề kháng cảm ứng với clindamycin, sử dụng thử nghiệm D test. Đặt hai khoanh giấy clindamycin và erythromycin gần nhau (đặt cách nhau 15 - 26 mm khi thử nghiệm cho staphylococci và

cách 12 mm cho *S. pneumoniae* và các *Streptococci* tan máu (tiêu huyết)  $\beta$ ). Nếu vùng ức chế quanh khoanh giấy clindamycin ở vị trí giữa hai khoanh giấy erythromycin và clindamycin bị dẹt tạo nên hình chữ D thì được đọc kết quả là D test dương tính và cho dù đường kính vùng ức chế của clindamycin đo được là bao nhiêu thì vẫn báo cáo kết quả là đề kháng với clindamycin.



**Hình 1.** Thử nghiệm D test dương tính

### **b. Enterococci**

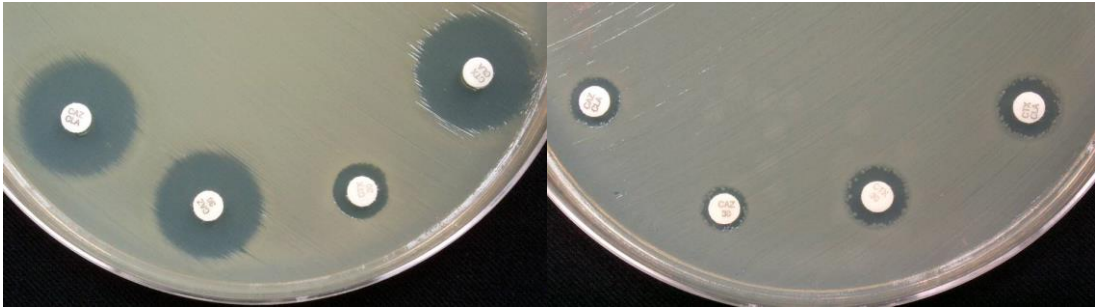
- Phát hiện đề kháng aminoglycoside nồng độ cao:

Khi chủng *Enterococci* đề kháng gentamicin và/hoặc streptomycin nồng độ cao thì khi phối hợp một aminoglycoside với một penicillin dù có tác dụng hiệp đồng cũng không có hiệu quả tiêu diệt chủng vi khuẩn đề kháng này. Khoanh giấy gentamicin hàm lượng cao (120  $\mu\text{g}$ ) và khoanh giấy streptomycin hàm lượng cao (300  $\mu\text{g}$ ) có thể sử dụng để phát hiện các chủng enterococci đề kháng với aminoglycoside nồng độ cao. Thử nghiệm với các aminoglycoside khác là không cần thiết vì tác dụng đối với enterococci không mạnh hơn gentamicin và streptomycin.

### **c. Trực khuẩn gram âm**

- Phát hiện  $\beta$ -lactamase phổ rộng (ESBLs) ở các chủng *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*.

Thử nghiệm đơn giản nhất thường được sử dụng để phát hiện ESBL là phương pháp khoanh giấy phối hợp khuếch tán. Dùng khoanh giấy ceftazidime, ceftazidime-acid clavulanic, cefotaxime và cefotaxime-acid clavulanic thử nghiệm kháng sinh đồ khoanh giấy khuếch tán. Nếu đường kính vùng ức chế của một hoặc cả hai khoanh giấy kháng sinh có phối hợp chất ức chế  $\beta$ -lactamase  $\geq 5$  mm so với đường kính vùng ức chế của khoanh giấy đơn tương ứng có nghĩa là chủng vi khuẩn thử nghiệm có sinh ESBL.

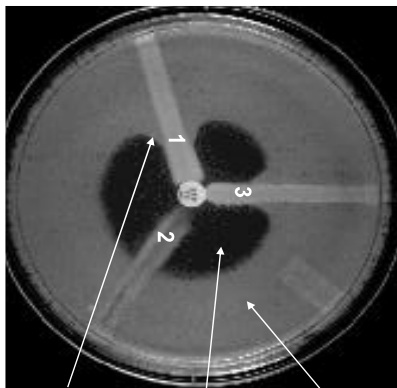


**Hình 2.** Thử nghiệm phát hiện ESBL (ESBL dương - hình bên trái, ESBL âm - hình bên phải)

Thử nghiệm phát hiện ESBL dương tính cũng không làm thay đổi phiên giải kết quả S, I, R của các kháng sinh cephalosporins mà nó chỉ có ý nghĩa cho kiểm soát nhiễm khuẩn và điều tra dịch tễ học đề kháng kháng sinh.

- Phát hiện carbapenemase ở các *Enterobacteriaceae*:

Có nhiều kỹ thuật có thể phát hiện được các chủng vi khuẩn có sinh carbapenemase nhưng kỹ thuật Hogde test cải tiến (MHT) là kỹ thuật khoanh giấy khuếch tán đơn giản nhất. Chủng *E. coli* ATCC® 25922 có nồng độ tương ứng với độ đục McFarland 0,5 được pha loãng 1/10 rồi dàn đều trên mặt thạch Mueller-Hinton. Đặt khoanh giấy ertapenem hoặc meronem ở giữa đĩa thạch rồi nhặt 3 - 5 khuẩn lạc (khóm) của chủng vi khuẩn thử nghiệm kéo một đường thẳng từ khoanh giấy ra đến mép đĩa thạch. Sau ủ ấm ở  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , khí trường bình thường trong vòng 16 - 20 giờ, nếu thấy vùng ức chế quanh đường cấy chủng thử nghiệm có hình như hoa thị có nghĩa là có sự phát triển tăng cường của chủng *E. coli* ATCC® 25922 quanh đường cấy chủng thử nghiệm do chủng thử nghiệm sinh carbapenemase làm mất hoạt tính của ertapenem hoặc meropenem.



Chủng *E. coli* ATCC 25922

Vùng ức chế do hoạt tính của ertapenem

Vùng chủng *E. coli* ATCC 25922 mọc được do sự có mặt carbapenemase bất hoạt ertapenem

**Hình 3.** Thử nghiệm Hodge test cải tiến phát hiện carbapenemase

Thử nghiệm phát hiện carbapenemase dương tính cũng không làm thay đổi phiên giải kết quả S, I, R của các kháng sinh carbapenem mà nó chỉ có ý nghĩa cho kiểm soát nhiễm khuẩn và điều tra dịch tễ học đề kháng thuốc.

Trên đây là các khuyến cáo hay hướng dẫn chung để các phòng xét nghiệm có cơ sở lựa chọn danh mục kháng sinh. Không có một danh mục kháng sinh cố định áp dụng cho tất cả các bệnh viện mà mỗi bệnh viện phải tự xây dựng danh mục kháng sinh cần thử nghiệm cho phù hợp với đặc điểm và nhu cầu của bệnh viện mình dựa trên tình hình kháng thuốc của các chủng vi khuẩn lưu hành tại bệnh viện, danh mục thuốc của bệnh viện, yêu cầu của các bác sĩ lâm sàng có tham khảo tư vấn của dược lâm sàng và hội đồng thuốc và điều trị của bệnh viện. Danh mục kháng sinh thử nghiệm có thể thay đổi và cập nhật cho phù hợp với tình hình thực tế trong từng giai đoạn. Kết quả kháng sinh đồ bị ảnh hưởng bởi rất nhiều yếu tố nên rất cần có sự kiểm duyệt và xem xét kết quả trước khi trả cho các bác sĩ lâm sàng. Cho dù phòng xét nghiệm có thực hiện QC định kỳ nhưng kết quả kháng sinh đồ vẫn có thể không chính xác do định danh vi khuẩn sai, do chủng vi khuẩn thử nghiệm không thuần... Do vậy, khi phiên giải và kiểm duyệt kết quả kháng sinh đồ, nếu thấy bất kỳ hiện tượng bất thường nào, cần phải xem xét cụ thể từ bước định danh vi khuẩn đến các bước thực hiện kỹ thuật kháng sinh đồ sao cho kết quả vi sinh góp phần cải thiện và nâng cao chất lượng chẩn đoán và điều trị bệnh nhân.

# KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG KHÁNG SINH ĐỒ

## 1. Mục đích

Kết quả cuối cùng của thử nghiệm kháng sinh đồ bị ảnh hưởng bởi rất nhiều yếu tố như chất lượng môi trường, chất lượng kháng sinh, mật độ vi khuẩn trong canh khuẩn, kỹ thuật của người thực hiện, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian nuôi cấy... Có một số yếu tố như mật độ vi khuẩn trong huyền dịch pha và nhiệt độ nuôi cấy dễ dàng kiểm soát được nhưng một số yếu tố khác như thành phần môi trường, sự khác biệt về chất lượng môi trường cho từng lô và hàm lượng kháng sinh trong từng khoanh giấy rất khó cho các phòng thí nghiệm có thể nhận biết được. Do đó, kết quả của thử nghiệm phải được kiểm soát đều đặn bằng các chương trình kiểm soát chất lượng.

Mục đích của việc kiểm soát chất lượng (Quality control - QC) nhằm giám sát toàn bộ quá trình thử nghiệm kháng sinh đồ để chắc chắn về tính chính xác và tính đúng của kết quả kháng sinh đồ. Độ chính xác (precise) và độ đúng (accuracy) của thử nghiệm được kiểm soát bằng việc sử dụng chủng chuẩn thử nghiệm với những kháng sinh có độ nhạy cảm đã biết trước. Các chủng chuẩn dùng kiểm soát chất lượng phải được tiến hành thử nghiệm với cùng quy trình giống như thử nghiệm cho các chủng vi khuẩn phân lập từ bệnh nhân. Đường kính vùng ức chế của các chủng chuẩn phải nằm trong giới hạn cho phép (CSLI M100). Khi kết quả thường xuyên nằm ngoài khoảng cho phép, cần xem xét các sai sót về mặt kỹ thuật hoặc sinh phẩm hóa chất. Mỗi loại sinh phẩm, hóa chất và mỗi bước trong quy trình làm cần được xem xét cụ thể để tìm ra sai sót và loại trừ các sai sót đó.

Mục tiêu của việc QC nhằm giám sát:

- Độ chính xác (precise) và độ đúng của quy trình kháng sinh đồ thường qui.
- Chất lượng hoá chất sử dụng cho thử nghiệm kháng sinh đồ.
- Năng lực làm và phiên giải kết quả kháng sinh đồ của nhân viên.

## 2. Lựa chọn chủng chuẩn dùng trong kiểm soát chất lượng

Các chủng chuẩn lựa chọn làm QC nên được lấy từ các nguồn được đăng ký như từ ngân hàng chủng ATCC... Các chủng chuẩn được CLSI khuyến cáo sử dụng để làm QC có giới hạn chấp nhận của vùng ức chế hoặc giá trị MIC được cung cấp đầy đủ trong tài liệu CLSI M100. Dưới đây là một số chủng QC và các đặc điểm của chủng QC thường được sử dụng. Các chủng QC này được chia làm hai nhóm: nhóm chủng QC thường qui và nhóm chủng QC bổ sung.

Các chủng QC thường qui được sử dụng thử nghiệm định kỳ hàng ngày hoặc hàng tuần để đảm bảo chất lượng của kết quả kháng sinh đồ được tin cậy nếu kết quả thử nghiệm của chủng QC nằm trong giới hạn cho phép.



Các chủng QC bổ sung được sử dụng để đánh giá thêm các tính chất riêng biệt vì chúng thường có thêm tính chất nhạy cảm/đề kháng đặc biệt hoặc có thể dùng để thay thế cho các chủng QC thường qui. Do vậy, không nhất thiết phải làm QC thường qui hàng ngày hoặc hàng tuần với các chủng QC bổ sung.

**Bảng 1.** Danh mục chủng QC, đặc điểm chủng và mục đích sử dụng

Chủng QC thường qui	Đặc điểm chủng	Sử dụng thử nghiệm khoan giấy khuếch tán cho	Sử dụng thử nghiệm xác định MIC cho	Thử nghiệm sàng lọc	Thử nghiệm khác
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212			Vi khuẩn Gram dương để nuôi cấy	Thạch chứa vancomycin HLAR	Đánh giá chất lượng môi trường cho thử nghiệm MIC sulfonamide hoặc trimethoprim Đánh giá nồng độ cho phép của cation trong mỗi lô/mẻ môi trường canh thang MH khi thử nghiệm MIC daptomycin
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 51299	Đề kháng vancomycin ( <i>vanB</i> ) và aminoglycoside nồng độ cao			Thạch chứa vancomycin HLAR	
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 29212	$\beta$ -lactamase âm tính	Chủng vi khuẩn Gram âm để nuôi cấy <i>M. meningitidis</i>	Chủng vi khuẩn Gram âm để nuôi cấy <i>M. meningitidis</i>		

Chủng QC thường qui	Đặc điểm chủng	Sử dụng thử nghiệm khoanh giấy khuếch tán cho	Sử dụng thử nghiệm xác định MIC cho	Thử nghiệm sàng lọc	Thử nghiệm khác
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218	Chứa $\beta$ -lactamase loại TEM-1 được mã hoá trên plasmid (non-ESBL)	$\beta$ -lactam phối hợp chất ức chế $\beta$ -lactamase	$\beta$ -lactam phối hợp chất ức chế $\beta$ -lactamase		
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247	BLNAR	<i>Haemophilus</i> spp.	<i>Haemophilus</i> spp.		
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	Nhạy cảm ampicillin	<i>Haemophilus</i> spp.	<i>Haemophilus</i> spp.		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603	ESBL SHV-18	Sàng lọc và kháng định ESBL $\beta$ -lactam phối hợp chất ức chế $\beta$ -lactamase	Sàng lọc và kháng định ESBL $\beta$ -lactam phối hợp chất ức chế $\beta$ -lactamase		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	CMRNG	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	Có $\beta$ -lactamase loại AmpC cảm ứng	Chủng vi khuẩn Gram âm để nuôi cấy	Chủng vi khuẩn Gram âm để nuôi cấy		Đánh giá nồng độ cho phép của cation trong mỗi lô/mẻ môi trường MH khi thử nghiệm gentamicin
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	$\beta$ -lactamase âm tính mecA âm tính	Chủng vi khuẩn Gram dương để nuôi cấy		D test	

Chủng QC thường qui	Đặc điểm chủng	Sử dụng thử nghiệm khoanh giấy khuếch tán cho	Sử dụng thử nghiệm xác định MIC cho	Thử nghiệm sàng lọc	Thử nghiệm khác
	Ít có giá trị trong thử nghiệm MIC vì rất nhạy cảm với hầu hết các kháng sinh				
Staphylococcus aureus ATCC® 43300	Đề kháng oxacillin, mecA dương	Thử nghiệm cefoxitin khoanh giấy	Thử nghiệm MIC cefoxitin	Thạch chứa oxacillin	
Streptococcus pneumoniae ATCC® 49619	Đề kháng trung gian với penicillin do thay đổi PBP	S. pneumoniae Streptococcus spp. N. meningitidis	S. pneumoniae Streptococcus spp. N. meningitidis	Thử nghiệm đề kháng clindamycin cảm ứng (MIC)	
Enterococcus faecalis ATCC® 29212			Cefaroline MIC		
Enterococcus faecalis ATCC® 33186					Sử dụng thay cho chủng Enterococcus faecalis ATCC® 33186 được dùng để kiểm tra nồng độ cho phép của thymidine trong môi trường Mueller-Hinton khi

<b>Chủng QC thường qui</b>	<b>Đặc điểm chủng</b>	<b>Sử dụng thử nghiệm khoanh giấy khuếch tán cho</b>	<b>Sử dụng thử nghiệm xác định MIC cho</b>	<b>Thử nghiệm sàng lọc</b>	<b>Thử nghiệm khác</b>
					thử nghiệm với các kháng sinh trimethoprim và sulfonamides
Haemophilus influenzae ATCC® 10211					Đánh giá chất lượng dinh dưỡng của mỗi lô/mẻ môi trường HTM
Klebsiella pneumoniae ATCC®BAA-1705	Sinh KPC MHT dương tính	Khả năng định kiểu hình sinh carbapenemase (MHT)			
Klebsiella pneumoniae ATCC®BAA-1706	Đề kháng carbapenem bằng cơ chế khác carpaenemase MHT âm tính	Khả năng định kiểu hình sinh carbapenemase (MHT)			
Staphylococcus aureus ATCC® BAA-976	Mang gene msr(A) đề kháng macrolide	Đánh giá khoảng cách đặt khoanh giấy erythromycin và clindamycin (D test âm tính)			
Staphylococcus aureus ATCC®BAA-977	Mang gene erm(A) đề kháng cảm ứng macrolide	Đánh giá khoảng cách đặt khoanh giấy erythromycin và clindamycin (D test dương tính)			

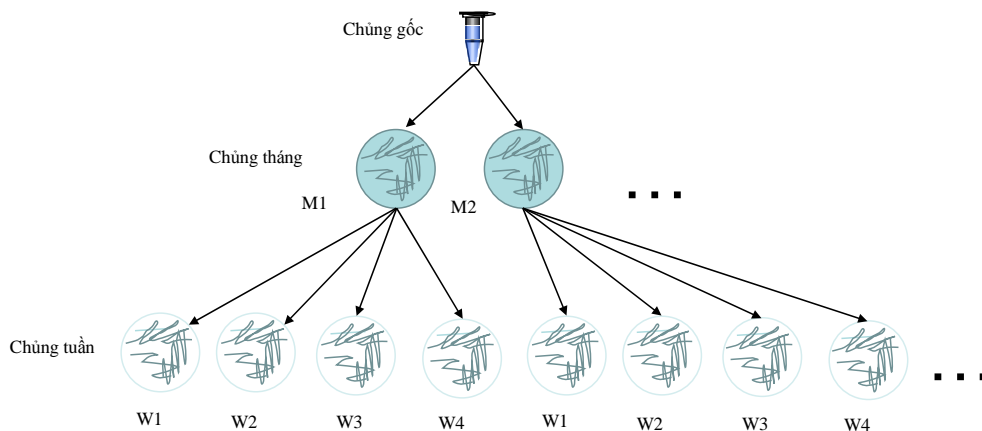
ATCC: American Type Culture Collection - Bộ sưu tập chủng chuẩn của Mỹ; BLNAR:  $\beta$ -lactamase negative, đề kháng ampicillin -  $\beta$ -lactamase âm tính, đề kháng ampicillin; CMRNG: Chromosomally mediated-resistant *N. gonorrhoeae* - *N. gonorrhoeae* đề kháng penicillin mã hoá bởi gene nằm trên chromosome; ESBL: Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase -  $\beta$ -lactamase phổ rộng; HLAR: high-level aminoglycoside resistant - đề kháng aminoglycoside nồng độ cao; HTM: *Haemophilus* Test Medium - môi trường HTM; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - *K. pneumoniae* sinh carbapenemase; MH: Mueller-Hinton - môi trường Mueller-Hinton; MHT: modified Hodge test - Hodge test cải tiến.

### 3. Lưu giữ chủng chuẩn

Lưu giữ chủng chuẩn thích hợp là yêu cầu bắt buộc để có thể đảm bảo các chủng chuẩn luôn giữ được tính chất ổn định và đường kính vùng ức chế của chúng luôn nằm trong khoảng giới hạn cho phép.

Để lưu giữ dài hạn chủng chuẩn, giữ chủng ở  $-20^{\circ}\text{C}$  hoặc thấp hơn (tốt nhất là giữ ở  $-60^{\circ}\text{C}$  hoặc ở nhiệt độ thấp hơn hoặc trong nitơ lỏng) trong môi trường bảo quản phù hợp như canh thang chứa 50% huyết thanh bào thai bê, canh thang chứa 10-15% glycerol, máu cừu đã loại sợi tơ huyết hoặc sữa gầy, hoặc giữ đông khô. Đặc biệt lưu ý một số chủng có thể mất plasmid nếu lưu giữ ở nhiệt độ cao hơn  $-60^{\circ}\text{C}$ .

Lưu giữ chủng duy trì thử nghiệm trên môi trường thạch thích hợp ở  $2-8^{\circ}\text{C}$ , và cấy chuyển hàng tuần với điều kiện không quá 3 tuần. Hàng tháng nên chuẩn bị lại chủng mới từ chủng đông khô, từ chủng giữ trong lạnh sâu hoặc từ chủng thương mại.



#### Sơ đồ 1. Hướng dẫn cấy chuyển chủng chuẩn

- Trước khi tiến hành thử nghiệm, cấy ria chủng lên đĩa thạch để thu được các khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ. Các chủng đông khô hoặc giữ âm nên cấy chuyển 2 lần trước khi tiến hành thử nghiệm.

- Nuôi cấy vi khuẩn để có được khuẩn lạc (khóm) riêng rẽ hoặc chuẩn bị canh khuẩn cho tiến hành thử nghiệm theo hướng dẫn thường qui chuẩn bị chủng.

- Chúng kiểm tra chất lượng được dùng để giám sát độ đúng và độ chính xác của thử nghiệm khoanh giấy khuếch tán, cần đảm bảo không có sự thay đổi đáng kể về đường kính vòng vô khuẩn. Trong trường hợp kết quả có sự thay đổi trong tính nhạy cảm kháng sinh mà không giải thích được thì cần chuẩn bị lại chủng chuẩn mới nuôi cấy.

#### **4. Tần số thử nghiệm kiểm soát chất lượng**

Để kiểm soát chất lượng của xét nghiệm kháng sinh đồ, sử dụng chủng chuẩn thích hợp để thực hiện QC cho mỗi ngày làm xét nghiệm. Nếu kết quả QC đáp ứng được điều kiện đã nêu thì có thể thực hiện QC hàng tuần (Khi phòng xét nghiệm thực hiện kháng sinh đồ ít hơn 1 lần/1 tuần thì phải thực hiện QC cho mỗi ngày hàng ngày, không được thực hiện hàng tuần). Ngoài ra, QC còn được thực hiện cho mỗi lô kháng sinh, môi trường mới, mỗi mẻ môi trường mới, mỗi lần nhận kháng sinh, môi trường.

##### **a. Thực hiện QC hàng ngày**

Kết quả thử nghiệm chấp nhận được khi không quá 3/30 kết quả liên tiếp cho mỗi phối hợp 1 kháng sinh/1 chủng nằm ngoài giới hạn cho phép. Trong trường hợp vượt quá con số này, phòng thí nghiệm cần tiến hành các bước tìm ra nguyên nhân và có hành động khắc phục.

##### **b. Thực hiện QC hàng tuần**

*Điều kiện chuyển thực hiện QC hàng ngày sang hàng tuần:*

Thử nghiệm tất cả các chủng chuẩn 20-30 lần liên tiếp và ghi nhận kết quả. Nếu không quá 1/20 hoặc 3/30 đường kính vòng vô khuẩn thu được từ thử nghiệm đơn lẻ 1 kháng sinh/1 chủng vi khuẩn nằm ngoài giới hạn cho phép, có thể chuyển sang thực hiện QC hàng tuần.

*Thực hiện QC hàng tuần:*

Trong trường hợp bất kỳ một kết quả QC nào nằm ngoài giới hạn cho phép, cần có ngay hành động khắc phục.

Trong trường hợp thêm một loại kháng sinh mới hoặc thay đổi nhà sản xuất, cần tiến hành thử nghiệm 20-30 ngày liên tiếp và ghi nhận kết quả trước khi được thử nghiệm hàng tuần. Trong trường hợp thay đổi phương pháp đọc kết quả đường kính vùng ức chế ví dụ như đọc bằng máy tự động, cần tiến hành 20-30 ngày thử nghiệm liên tiếp để đánh giá sự phù hợp của yếu tố mới.

#### **5. Các bước thực hiện QC**

- Lựa chọn chủng làm QC: Trong tài liệu CLSI M100 cập nhật theo từng năm, ở mỗi bảng danh mục hướng dẫn đặt kháng sinh cho từng loài, từng nhóm vi khuẩn, luôn có một phần hướng dẫn ở góc trên phải khuyến cáo chủng.

- QC thực hiện khi làm kháng sinh đồ cho loài, nhóm vi khuẩn đó.

- Cách thức thực hiện QC: Tiến hành như đối với các chủng của bệnh nhân theo quy trình thường hiện. Điều kiện thực hiện như môi trường, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian nuôi cấy cũng được khuyến cáo đầy đủ ở phần góc trên trái của bảng hướng dẫn danh mục kháng sinh cần thử nghiệm cho từng loài, nhóm vi khuẩn.

- Đọc và ghi nhận kết quả QC: Đọc kết quả đường kính vùng ức chế tính ra mm nếu làm kỹ thuật kháng sinh đồ khoan giấy khuếch tán hoặc giá trị MIC nếu làm kháng sinh đồ định lượng. Các giá trị đọc được sẽ được so sánh với khoảng cho phép của từng chủng vi khuẩn chuẩn sử dụng làm QC ở các bảng (Bảng 2 cho đường kính vùng ức chế hoặc 3 cho giá trị MIC) được cung cấp cuối tài liệu CLSI M100 cập nhật hàng năm. Nếu các giá trị đọc được nằm trong giới hạn chấp nhận, ghi nhận kết quả QC đạt. Nếu có giá trị QC nằm ngoài khoảng chấp nhận, xem xét nguyên nhân sai lệch và có các hành động khắc phục thích hợp (mục 6).

**Bảng 2.** Khoan giấy khuếch tán: Khoảng cho phép của từng chủng vi khuẩn chuẩn sử dụng làm QC

Tác nhân kháng khuẩn	Đường kính	Escherichia Coli ATCC 25922	Staphylococcus aureus ATCC 25923	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Escherichia Coli ATCC 35218	Klebsiella pneumoniae ATCC 700603
<i>Amikacin</i>	30 µg	19-26	20-26	18-26	-	-
<i>Amoxicillin-clavulanate</i>	20/10 µg	18-24	28-36	-	17-22	-
<i>Ampicillin</i>	10 µg	15-22	27-35	-	6	-
<i>Ampicillin-Sulbactam</i>	10/10 µg	19-24	29-37	-	13-19	-
<i>Azithromycin</i>	15 µg	-	21-26	-	-	-
<i>Aziocillin</i>	75 µg	-	-	24-30	-	-
<i>Aztreonam</i>	30 µg	28-36	-	23-29	31-38	10-16
<i>Aztreonam-avibactam</i>	30/20 µg	32-38	-	24-30	31-38	26-32

**Bảng 3. MIC: Khoảng cho phép của từng chủng vi khuẩn chuẩn sử dụng làm QC**

Tác nhân kháng khuẩn	Staphylococcus aureus ATCC 29213	Enterococcus faecalis ATCC 29212	Escherichia Coli ATCC 25922	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Escherichia Coli ATCC 35218	Klebsiella pneumoniae ATCC 700603
<i>Amikacin</i>	1-4	64-256	0,5-4	1-4	-	-
<b><i>Amikacin-fosfomycin</i> (5:2)</b>	<b>0,5/0,2-4/1,6</b>	<b>32/12,8-128/51,2</b>	<b>0,25/0,1-2/0,8</b>	<b>1/0,4-8/3,2</b>	-	-
<i>Amoxicillin</i>	-	-	-	-	-	>128
<i>Amoxicillin-clavulanate</i> (2:1)	0,12/0,06-0,5/0,25	0,25/0,12-1,0/0,5	2/1-8/4	-	4/2-16/8	4/2-16/8
<i>Ampicillin</i>	0,5-2	0,5-2	2-8	-	>32	>128
<i>Ampicillin-Sulbactam</i> (2:1)	-	-	2/1-8/4	-	8/4-32/16	8/4-32/16
<i>Azithromycin</i>	0,5-2	-	-	-	-	-
<i>Aziocillin</i>	2-8	1-4	8-32	2-8	-	-
<i>Aztreonam</i>	-	-	0,06-0,25	2-8	0,03-0,12	8-16
<i>Aztreonam-avibactam</i>	-	-	0,03/4-0,12/4	2/4-8/4	0,015/4-0,06/4	0,06/4-0,5/4

Ghi nhận kết quả: Dưới đây là một ví dụ về biểu mẫu ghi nhận kết quả QC. Mỗi phòng xét nghiệm có thể tự thiết kế biểu mẫu ghi nhận kết quả QC cho phù hợp. Lưu ý là nếu không ghi nhận và lưu giữ đầy đủ các kết quả QC thì cho dù phòng xét nghiệm có thực hiện QC cũng vẫn coi như là không thực hiện QC vì các bằng chứng lưu giữ QC có vai trò cho việc xem xét, đánh giá và đảm bảo chất lượng kháng sinh đồ của phòng xét nghiệm.



**Bảng 4: Kiểm soát chất lượng kháng sinh đồ**

LOT #	Hạn sử dụng	QC PANEL		Ngày làm QC	19/07/2012	26/07/2012
		E.Coli ATCC 25922	Kháng sinh	Khoảng chấp nhận	2	2
OH3429	30/08/2012	AMPICILLIN	AM	16-22	20	19
OK3097	15/10/2012	GENTAMICIN	GM	19-26	25	24
OJ3281	15/09/2012	TOBRAMYCIN	TM	18-26	24	24
OE3379	30/05/2012	CEFOTAXIME	CTX	29-35	32	31
OJ3121	30/09/2012	CEFTRIAZONE	CRO	29-35	34	33
OJ3058	30/09/2012	MEROPENEM	MEM	28-34	31	32

## 6. Hành động khắc phục

### a. Các hành động khắc phục ngay<sup>a</sup>

Nếu không tìm được nguyên nhân của hiện tượng giá trị nằm ngoài khoảng chấp nhận, phải tiến hành các hành động khắc phục sau:

- Kiểm tra chủng vi khuẩn và khoan giấy kháng sinh có giá trị nằm ngoài khoảng chấp nhận ngay trong ngày phát hiện ra hiện tượng bất thường hoặc ngay khi có chủng. Tiến hành làm QC khoan giấy với chủng vi khuẩn này trong 5 ngày liên tiếp và ghi lại kết quả.

+ Nếu kết quả của 5 ngày liên tiếp đều trong khoảng giới hạn chấp nhận, không cần tiến hành thêm hành động khắc phục nào nữa.

+ Nếu có bất kỳ kết quả nào trong 5 ngày thực hiện nằm ngoài khoảng giới hạn chấp nhận, cần tiến hành thêm các hành động khắc phục khác.

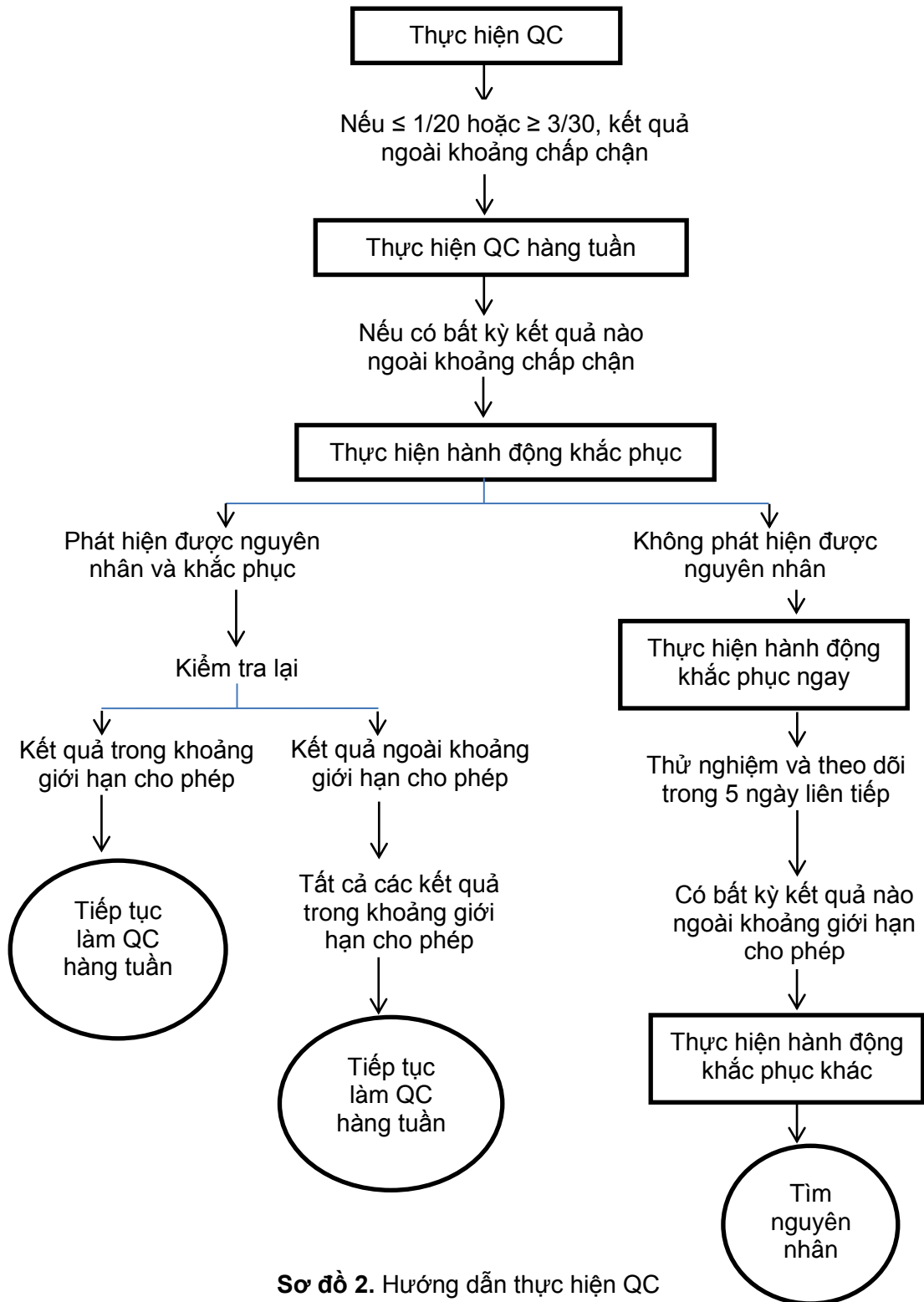
- Thực hiện QC hàng ngày cho đến khi đạt được kết quả QC ổn định.

### b. Các hành động khắc phục khác<sup>b</sup>

Khi các hành động khắc phục ngay không giải quyết được vấn đề, nguyên nhân của vấn đề có thể là lỗi hệ thống chứ không phải là lỗi ngẫu nhiên. Cần tiến hành ngay các hành động truy tìm nguyên nhân và hành động khắc phục (tham khảo bảng 3C tài liệu CLSI M100).

Nếu cần thiết, lấy chủng chuẩn mới và các môi trường, khoan giấy, kể cả độ đục McFarland mới, có thể lấy từ nhà cung cấp mới để thử nghiệm. Nếu phát hiện ra vấn đề liên quan đến nhà cung cấp, phải liên lạc và gửi các kết quả thử nghiệm đến cho nhà cung cấp. Cũng có thể trao đổi chủng chuẩn và các vật liệu như môi trường, khoan giấy với các phòng xét nghiệm khác có sử dụng cùng phương pháp QC để tìm ra được nguồn gốc của các lỗi hệ thống không giải thích được. Phải làm kháng sinh đồ bằng phương pháp khác cho đến khi nguyên nhân được giải quyết.

Nếu tìm ra nguyên nhân và đã khắc phục, thực hiện QC trong 5 ngày liên tiếp như sơ đồ. Nếu không tìm ra nguyên nhân nhưng kết quả QC nằm trong khoảng chấp nhận mà không hề có bất kỳ hành động khắc phục nào, tiến hành QC 20 hoặc 30 ngày liên tiếp, ghi nhận kết quả và trở về QC hàng tuần.



**Sơ đồ 2.** Hướng dẫn thực hiện QC

## **Chương V**

# **ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM VI SINH**

## **HƯỚNG DẪN BỐ TRÍ PHÒNG XÉT NGHIỆM VI SINH VÀ CÁC TRANG THIẾT BỊ SỬ DỤNG TRONG PHÒNG XÉT NGHIỆM VI SINH**

### **1. Mục đích**

- Tạo môi trường làm việc an toàn cho tất cả nhân viên làm việc trong đó.
- Đưa ra những biện pháp bảo vệ hữu hiệu khi thiết kế phòng xét nghiệm Vi sinh, giúp thực hiện đúng yêu cầu trong thiết kế phòng xét nghiệm Vi sinh.

### **2. Phạm vi áp dụng**

- Tiêu chuẩn được áp dụng để lập, thẩm định dự án đầu tư xây dựng công trình, thiết kế xây dựng công trình, thiết kế xây dựng cải tạo khoa Xét nghiệm Vi sinh tại bệnh viện đa khoa khu vực, bệnh viện đa khoa tỉnh và Trung ương.

- Có thể vận dụng khi xây dựng khoa Xét nghiệm tại bệnh viện đa khoa của các Bộ, ngành, bệnh viện tuyến huyện và bệnh viện ngoài công lập được điều chỉnh theo từng quy mô cụ thể.

### **3. Trách nhiệm**

- Các bệnh viện có khoa Vi sinh cần tuân thủ các quy định về bố trí và thiết kế phòng xét nghiệm Vi sinh theo hướng dẫn này.

- Toàn thể nhân viên khoa xét nghiệm Vi sinh và những người tham gia công việc tại khoa phải tuân thủ đúng quy định của hướng dẫn.

- Cán bộ QLCL, tổ trưởng chuyên môn chịu trách nhiệm giám sát việc tuân thủ hướng dẫn này.

### **4. Nguyên lý**

Điều quan trọng trong thiết kế phòng xét nghiệm Vi sinh là tạo môi trường làm việc an toàn cho tất cả nhân viên làm việc trong đó. Vì vậy, tất cả các mối nguy hại đến sức khỏe và an toàn của con người đều phải được xác định và đánh giá cẩn thận. Từ đó có thể đưa ra những biện pháp bảo vệ hữu hiệu khi thiết kế phòng xét nghiệm Vi sinh.

### **5. Kiểm tra chất lượng**

- Tất cả các thiết bị phải được theo dõi, kiểm tra thường xuyên, bảo trì và hiệu chuẩn đúng định kỳ.

- Các thiết bị điện tử, ổ cắm điện, dây điện phải được kiểm tra thường xuyên.
- Không khí trong các phòng làm việc cần được kiểm tra vi sinh định kỳ.

## 6. An toàn

Cần có phương tiện chữa cháy (bình cứu hỏa), bộ xử lý tràn đổ. Nhân viên phòng xét nghiệm cần được hướng dẫn quy trình xử lý sự cố (cháy nổ, tràn đổ hóa chất độc hại...).

Phòng xét nghiệm vi sinh cần đảm bảo các tiêu chuẩn an toàn sinh học cấp II, theo qui định (Xem thêm bài “An toàn sinh học trong phòng xét nghiệm”).

## 7. Nội dung thực hiện

### a. Quy định chung

- Khoa Vi sinh là nơi tiến hành các kỹ thuật đặc biệt bằng các phương pháp vi sinh, ký sinh trùng, để chẩn đoán khám chữa bệnh và nghiên cứu khoa học.

- Hạ tầng cơ sở phải đảm bảo an toàn cho bác sĩ, kỹ thuật viên và môi trường xung quanh.

- Việc quản lý thiết bị theo đúng quy chế quản lý và sử dụng vật tư thiết bị y tế.

- Căn cứ vào chức năng nhiệm vụ và bảo đảm hoạt động chuyên môn, khoa Vi sinh gồm những bộ phận:

+ Các không gian xét nghiệm theo đặc thù của phòng xét nghiệm Vi sinh.

+ Bộ phận kỹ thuật: Nhận bệnh phẩm, trả kết quả, pha thuốc thử, chuẩn bị môi trường, hấp/rửa dụng cụ, cung cấp nước cất, xử lý bệnh phẩm, kho (*kho lạnh và vật tư tiêu hao*).

+ Bộ phận quản lý: Hành chính, trực, nhân viên, tẩm/thay đồ, trưởng khoa.

- Khoa Vi sinh phải đảm bảo điều kiện vệ sinh môi trường, yêu cầu chống lây nhiễm cao nhất trong bệnh viện.

### b. Yêu cầu về dây chuyền hoạt động

- Dây chuyền hoạt động của khoa Vi sinh phải đảm bảo yêu cầu sạch bản một chiều, tránh nhiễm chéo. Công trình được phân chia cấp độ sạch cho từng khu vực.

- Các giải pháp kỹ thuật và thiết bị sử dụng phải đảm bảo an toàn lao động của nhân viên và bệnh nhân.

- Phù hợp với các yêu cầu về tổ chức quản lý và định biên (*theo quy định của Bộ Y tế*).

- Bố trí riêng biệt giữa thuốc thử, dụng cụ sạch với các đồ nhiễm bẩn, nhiễm khuẩn và chất thải.

- Tủ an toàn sinh học đạt yêu cầu về môi trường sạch, vô khuẩn.
- Khu vực kỹ thuật nghiệp vụ: Khu vực có yêu cầu về môi trường sạch ở mức trung bình, là không gian làm việc chính của khoa, là không gian chuyển tiếp giữa khu vực sạch với khu phụ trợ bao gồm:
  - + Các phòng xét nghiệm.
  - + Phòng máy.
  - + Phòng chuẩn bị môi trường, chuẩn bị mẫu và hóa chất.
  - + Các phòng chức năng (*phòng lấy máu, lấy mẫu bệnh phẩm...*)
  - + Kho vật phẩm, kho dụng cụ.
  - + Phòng rửa, tiệt trùng.
- Khu vực phụ trợ: khu vực dành cho các hoạt động của nhân viên, gồm các bộ phận:
  - + Sảnh đón tiếp, nhận/trả kết quả.
  - + Phòng hành chính, giao ban/đào tạo (*phòng bác sĩ, kỹ thuật viên xét nghiệm...*).
  - + Phòng Trưởng khoa.
  - + Kho (*hóa chất, vật tư và thiết bị - dụng cụ y tế*).
  - + Khu vệ sinh (*tắm, rửa, thay đồ...*).

### **c. Yêu cầu về giải pháp thiết kế kiến trúc**

- Tổ chức không gian: Giải pháp thiết kế tổ chức không gian trong khoa Vi sinh phải đảm bảo các yêu cầu:
  - + Đảm bảo hoạt động độc lập của các phòng xét nghiệm.
  - + Giải pháp thiết kế kiến trúc theo các khu vực thống nhất.
  - + Khu vực rửa, tiệt trùng và khu phụ trợ riêng biệt; dây chuyền hoạt động sạch, bản một chiều.
  - + Phù hợp với yêu cầu lắp đặt và vận hành các thiết bị quy định tại Danh mục trang thiết bị y tế.
- Các yêu cầu về kích thước, không gian:
  - + Các phòng chức năng:
    - Chiều cao trong phòng khu nghiệp vụ kỹ thuật (*từ sàn tới trần - tùy theo yêu cầu lắp đặt của thiết bị*): Không thấp hơn 3,1m.
    - Chiều cao trong phòng khu phụ trợ: Không thấp hơn 2,8m.
    - Chiều cao của tầng kỹ thuật từ trần tới hạn dưới kết cấu dầm (*dành cho các hệ thống đường ống, thiết bị kỹ thuật*): Không nhỏ hơn 0,2m.

+ Cầu thang, đường dốc (nếu có):

- Chiều rộng bản thang (1 vế): Không nhỏ hơn 1,8m.
- Chiều rộng chiếu nghỉ: Không nhỏ hơn 2,4m.
- Chiều cao của các chiếu nghỉ: Không thấp hơn 2,8m.

+ Kích thước (chiều rộng x dài) buồng thang máy (cabin):

- Cho nhân viên: Không nhỏ hơn 1,1m x 1,4m.
- Cho bệnh nhân: Không nhỏ hơn 1,1m x 2,3m.

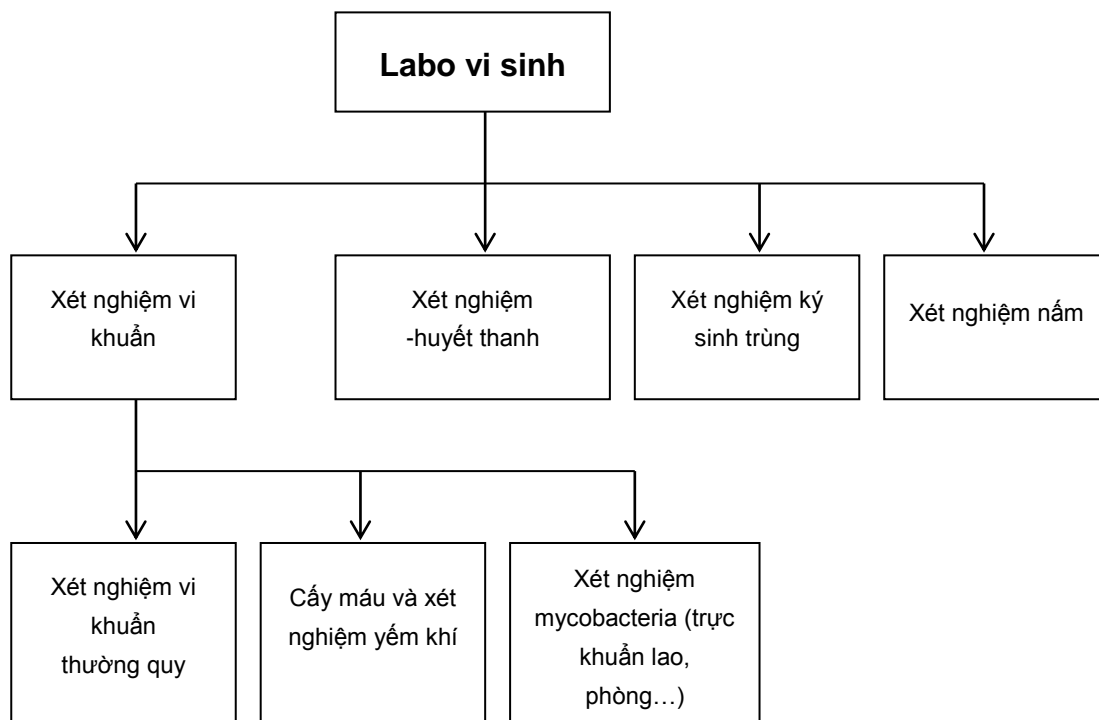
+ Hành lang:

- Chiều rộng hành lang bên: Không nhỏ hơn 1,8m
- Chiều rộng hành lang giữa: Không nhỏ hơn 2,4m.
- Chiều cao của hành lang: Không thấp hơn 2,8m.

+ Cửa:

- Chiều rộng cửa ra vào hai cánh: Không nhỏ hơn 1,2m.
- Chiều rộng cửa ra vào một cánh: Không nhỏ hơn 0,9m.
- Chiều cao của các cửa ra vào: Không thấp hơn 2,1m.

- Yêu cầu diện tích đối với khoa Vi sinh:



**Sơ đồ dây chuyền công năng**

Diện tích sử dụng các phòng chức năng khoa Vi sinh

Số thứ tự	Tên phòng	Diện tích/Quy mô (m <sup>2</sup> )			Ghi chú
		Quy mô 1 250 - 350 giờ	Quy mô 2 400 - 500 giờ	Quy mô 3 Trên 550 giờ	
<b>KHU NGHIỆP VỤ KỸ THUẬT</b>					
1	Labo vi sinh	40	52	70	<i>Không nhỏ hơn</i>
2	Phòng sạch	9	9	9	<i>Tủ ATSH</i>
3	Chuẩn bị môi trường, mẫu	18	24	36	<i>Không nhỏ hơn</i>
4	Phòng rửa/tiệt trùng	12	18	24	<i>- nt -</i>
<b>KHU PHỤ TRỢ</b>					
5	Trực + nhận/ trả kết quả	12	18	24	<i>Có thể kết hợp với các khoa xét nghiệm khác</i>
6	Phòng lấy mẫu	12	18	24	<i>Liên kế với phòng thủ tục</i>
7	Kho	12	18	24	<i>- nt -</i>
8	Phòng Hành chính, giao ban, đào tạo	18	24	32	<i>Có thể kết hợp với các khoa xét nghiệm khác</i>
9	Phòng Trưởng khoa	12	18	24	<i>Không nhỏ hơn</i>
10	Phòng Nhân viên	18	24	36	<i>- nt -</i>
11	Phòng Vệ sinh/thay đồ nhân viên	2 x 12	2 x 12	2 x 18	<i>Có thể kết hợp với các khoa xét nghiệm khác</i>
Cộng		187	247	339	

**d. Yêu cầu về giải pháp kỹ thuật**

- Kết cấu:

Kết cấu công trình phải đảm bảo độ bền vững (sử dụng khung bê tông cốt thép, khung thép).

- Yêu cầu về hoàn thiện công trình:

+ Sàn:

- Sàn giữa các không gian không chên cốt, không có gờ cửa đảm bảo phẳng, nhẵn, không trơn trượt, chịu được hóa chất, chống thấm và dễ cọ rửa vệ sinh.

- Sàn bên trong các phòng rửa tiệt trùng, chuẩn bị môi trường chuẩn bị mẫu phải chống trơn, thu nước khi cọ rửa.

- Giao tuyến của sàn với tường đảm bảo dễ vệ sinh, chống đọng và bám bụi.

+ Tường:

- Tường được hoàn thiện bằng vật liệu chất lượng cao đảm bảo lớp che phủ bề mặt phẳng, nhẵn.

- Tường bên trong các phòng labo sử dụng vật liệu chống thấm, chống ăn mòn hóa chất, dễ cọ rửa, sơn kháng khuẩn.

+ Trần:

- Trần phải có bề mặt phẳng, nhẵn (không bám bụi) chống thấm và phải đáp ứng lắp đặt được các thiết bị (chiếu sáng, phòng cháy chữa cháy, điều hòa không khí và các thiết bị kỹ thuật...)

+ Cửa đi:

- Cửa ra vào có khuôn, cánh cửa bằng vật liệu tổng hợp hoặc kim loại kết hợp với kính trong hoặc mờ. Các cửa ra vào đều phải có chốt, khóa an toàn.

+ Cửa sổ:

- Cửa sổ có khuôn, cánh cửa bằng vật liệu tổng hợp hoặc kim loại kết hợp với trong hoặc mờ để chiếu sáng tự nhiên.

+ Lắp đặt thiết bị kỹ thuật:

- Lắp đặt thiết bị kỹ thuật của tủ an toàn sinh học (cửa ngăn, passbox dụng cụ...) phải đảm bảo yêu cầu kỹ thuật, hoàn thiện không để không khí bẩn, bụi lọt vào trong phòng.

- Chiếu sáng:

+ Khoa Vi sinh phải đảm bảo điều kiện chiếu sáng theo yêu cầu cho từng khu vực, đảm bảo điều kiện nhìn rõ trong công tác xét nghiệm Phòng xét nghiệm phải bảo đảm ánh sáng đủ cho các hoạt động: Ánh sáng trong khu vực xét nghiệm có độ rọi tối thiểu là 400 lux, khu vực rửa, tiệt trùng, chuẩn bị mẫu, môi trường, tắm, thay đồ là 250 lux, khu vực hành chính và phụ trợ là 140 lux; (Theo thông tư số 25/2012/TT-BYT, ngày 29/11/2012 về Ban hành qui chuẩn kỹ thuật quốc gia về thực hành và an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm).

- Khu phụ trợ: ưu tiên chiếu sáng nhân tạo.

- Khu labo xét nghiệm: chiếu sáng nhân tạo kết hợp chiếu sáng tự nhiên.

+ Yêu cầu về độ rọi tối thiểu của ánh sáng theo quy định.

Chú thích: *Độ rọi tối thiểu là lượng ánh sáng tối thiểu trên đơn vị diện tích (được tính đối với mặt phẳng ngang, cao trên 0,8m tính từ sàn).*



- Thông gió và điều hòa không khí:

+ Khoa Vi sinh phải đảm bảo điều kiện thông gió, đáp ứng yêu cầu cho từng khu vực:

- Khu phụ trợ ưu tiên sử dụng giải pháp thông gió tự nhiên.

- Khu vực kỹ thuật nghiệp vụ (*phòng xét nghiệm, các phòng kỹ thuật*) sử dụng giải pháp thông gió tự nhiên kết hợp thông gió nhân tạo.

- Tủ an toàn sinh học sử dụng biện pháp thông gió nhân tạo.

+ Các yêu cầu nhiệt độ, độ ẩm và luân chuyển không khí theo quy định.

+ Áp suất không khí tủ ATSH phải cao hơn (+) so với khu lân cận.

+ Khí thải: Khí thoát của tủ ATSH phải thu bằng ống kín, được xử lý đảm bảo tiêu chuẩn trước khi thải ra môi trường.

- Yêu cầu về phòng cháy và chữa cháy:

+ Khoa Vi sinh được thiết kế phòng cháy và chữa cháy tuân theo những quy định trong Tiêu chuẩn TCVN - 2622: 1995.

+ Phải có vòi nước cấp cứu bong hóa chất, bố trí hợp lý đảm bảo an toàn cho kỹ thuật viên khi có sự cố.

+ Khoảng cách tối đa từ cửa đi của các phòng đến lối thoát nạn gần nhất trong khoa Vi sinh theo quy định.

- Cấp điện:

+ Khoa Vi sinh phải được cấp đủ điện và liên tục 24 giờ/ngày, đáp ứng yêu cầu chiếu sáng, sử dụng các thiết bị.

+ Hệ thống mạng cấp điện của khoa Vi sinh phải đảm bảo các yêu cầu:

- Hệ thống điện cấp chiếu sáng phải độc lập với hệ thống điện cấp cho các thiết bị.

- Hệ thống thiết bị chiếu sáng phải đảm bảo đủ độ rọi tối thiểu theo yêu cầu.

- Hệ thống dây dẫn và thiết bị kiểm soát, cung cấp điện phải đảm bảo an toàn và phù hợp các thông số kỹ thuật (*công suất, chất lượng...*).

- Tuỳ theo yêu cầu các Labo được cung cấp điện 1 chiều hoặc điện 3 pha.

- Tiếp đất toàn bộ hệ thống.

- Cấp thoát nước:

+ Cấp nước: Phải được cấp nước sạch, nước khử ion liên tục trong ngày đáp ứng cho yêu cầu hoạt động chuyên môn, sinh hoạt thông thường.

+ Thoát nước: Phải có hệ thống thoát nước thải; Nước thải khi làm các kỹ thuật độc hại phải được thu gom xử lý trước khi thoát ra hệ thống xử lý nước thải chung của bệnh viện.

+ Bồn nước rửa tay: Mỗi phòng phải có ít nhất một bồn nước rửa tay bằng vật liệu inox, đặt tách biệt với bàn làm việc.

- Chất thải: Chất thải sinh hoạt, y tế phải được phân loại và chuyển tới bộ phận xử lý chung của bệnh viện tuân thủ theo quy định của quy chế Quản lý chất thải y tế ban hành kèm theo Quyết định số 2575/1999/QĐ-BYT ngày 27/8/1999 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

- Công nghệ thông tin: Phải có hệ thống kết nối thông tin liên lạc giữa các bộ phận, với các khoa khác trong bệnh viện và các cơ sở bên ngoài bằng hệ thống tổng đài, mạng máy tính nội bộ, truyền dữ liệu và hình ảnh.

### **e. Bố trí trang thiết bị**

Việc sắp xếp, quản lý và bảo dưỡng trang thiết bị tốt nhằm nâng cao tính hiệu quả của hệ thống các phòng xét nghiệm trên cả hai mặt quản lý nghiệp vụ và quản lý kỹ thuật, nhằm đảm bảo tính khách quan, trung thực và chính xác trong việc đánh giá chất lượng các xét nghiệm.

- **Sắp xếp thiết bị trong khoa Vi sinh:** Việc sắp xếp các trang thiết bị trong khoa Vi sinh phải nhằm mục đích giảm tối đa nguy cơ sai sót, dễ làm vệ sinh và bảo dưỡng có hiệu quả, nhằm tránh nhiễm chéo, tích tụ bụi và bẩn, tránh những tác động bất lợi đối với kết quả xét nghiệm.

+ Nhóm thiết bị đo, phân tích: nên bố trí xa các thiết bị tạo độ rung cơ học, phát sinh nguồn nhiệt, gây âm, nhiễu điện từ...

+ Nhóm thiết bị phát sinh nguồn nhiệt như các loại tủ sấy, tủ lạnh, nồi hấp tiệt trùng... Nên bố trí tập trung tại phòng chuẩn bị dụng cụ nhằm hạn chế thấp nhất ảnh hưởng của chúng đến các thiết bị khác.

+ Nhóm thiết bị quang học và điện tử nên bố trí tại nơi khô ráo, tránh nhiệt độ và độ ẩm cao làm ảnh hưởng đến độ chính xác của thiết bị.

#### **- An toàn sử dụng và vận hành trang thiết bị xét nghiệm**

+ Để đảm bảo an toàn khi sử dụng và vận hành trang thiết bị xét nghiệm, việc lắp đặt các trang thiết bị xét nghiệm phải hạn chế được tối đa nguy cơ sai sót hoặc tạp nhiễm. Sau mỗi lần sử dụng trang thiết bị hoặc dụng cụ, cần phải khử trùng hoặc làm vệ sinh sạch sẽ mới tiến hành thực hiện các xét nghiệm khác.

+ Bố trí trang thiết bị nên theo nguyên tắc một chiều, tạo điều kiện thuận lợi cho người sử dụng đồng thời tránh được tác động trong quá trình nhân viên phòng xét nghiệm phải di chuyển nhiều.

+ Phải có bản hướng dẫn sử dụng các trang thiết bị. Bản hướng dẫn này phải được đặt gần trang thiết bị để người sử dụng tiện tham khảo.

+ Các trang thiết bị phân tích tự động và phần mềm kèm theo phải cho kết quả chính xác như yêu cầu và phải đáp ứng được các tiêu chuẩn kỹ thuật liên quan đến thử nghiệm. Các thiết bị này phải được hiệu chuẩn trước khi sử dụng và hiệu chuẩn định kỳ để đảm bảo kết quả xét nghiệm không bị sai số.

+ Mỗi thiết bị phải có sổ ghi chép được gọi là sổ lý lịch máy và nhật ký vận hành.

+ Các thiết bị có dấu hiệu hoạt động quá tải, vận hành không đúng cách, cho kết quả không đáng tin cậy, hỏng hóc hoặc không đạt tiêu chuẩn kỹ thuật phải được đánh dấu và dán nhãn rõ ràng, không được đưa vào sử dụng mà phải cách ly, chờ sửa chữa cho tới khi kiểm tra lại và kết quả hiệu chỉnh đạt yêu cầu mới được phép sử dụng.

+ Lập kế hoạch bảo dưỡng các thiết bị phòng xét nghiệm.

- Có các thường quy chuẩn sử dụng trang thiết bị.
- Có hồ sơ quản lý trang thiết bị theo ISO.

#### **- Các yêu cầu về an toàn sinh học phòng xét nghiệm Vi sinh**

(Điều kiện của cơ sở xét nghiệm an toàn sinh học cấp II)

Khu vực xét nghiệm phải đáp ứng các điều kiện sau:

+ Điều kiện về cơ sở vật chất:

- Sàn, tường, bàn xét nghiệm phải bằng phẳng, không thấm nước, chịu được nhiệt và các loại hóa chất ăn mòn và dễ cọ rửa vệ sinh;
- Có bồn nước rửa tay, dụng cụ rửa mắt khẩn cấp, hộp sơ cứu;
- Có điện với hệ thống điện tiếp đất và có nguồn điện dự phòng;
- Có nước sạch, đường ống cấp nước trực tiếp cho khu vực xét nghiệm phải có thiết bị chống chảy ngược để bảo vệ hệ thống nước công cộng;
- Có các thiết bị phòng, chống cháy nổ;
- Có đủ ánh sáng để thực hiện xét nghiệm.
- Có hệ thống thu gom, xử lý hoặc trang thiết bị xử lý nước thải. Đối với cơ sở xét nghiệm đang hoạt động trước ngày 01/7/2016 phải có kết quả xét nghiệm nước thải đạt quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về môi trường trước khi thải vào nơi chứa nước thải chung;
- Phải riêng biệt với các phòng khác của cơ sở xét nghiệm;
- Có biển báo nguy hiểm sinh học trên cửa ra vào của khu vực xét nghiệm theo Mẫu quy định ở Nghị định 103/2016/NĐ-CP.

## NGUY HIỂM SINH HỌC

Cấp độ an toàn sinh học: .....

Người chịu trách nhiệm về an toàn sinh học: .....

Số điện thoại trong trường hợp khẩn cấp: .....

Số điện thoại cơ quan: .....Số điện thoại nhà riêng: .....

Người chịu trách nhiệm có tên trên có quyền cho phép đối tượng có liên quan ra vào khu vực xét nghiệm

### \* Ghi chú:

#### I. Màu sắc của biển báo:

- Màu nền của biển báo là màu vàng;
- Màu của chữ và biểu tượng là màu đen.

#### II. Kích thước: Khổ giấy A4.

#### + Điều kiện về trang thiết bị:

• Các thiết bị xét nghiệm phù hợp với kỹ thuật và mẫu bệnh phẩm hoặc vi sinh vật được xét nghiệm;

- Có các bao bì, dụng cụ, thiết bị lưu chứa chất thải y tế theo quy định;
- Có tủ an toàn sinh học;
- Có thiết bị hấp chất thải y tế lây nhiễm hoặc thiết bị khử khuẩn;

• Các trang thiết bị bảo hộ cá nhân phù hợp với loại kỹ thuật xét nghiệm thực hiện tại cơ sở xét nghiệm an toàn sinh học cấp II.

#### + Điều kiện về nhân sự:

• Số lượng nhân viên: Có ít nhất 02 nhân viên xét nghiệm. Nhân viên trực tiếp thực hiện xét nghiệm vi sinh vật (sau đây gọi tắt là nhân viên xét nghiệm) phải có văn bằng, chứng chỉ đào tạo phù hợp với loại hình xét nghiệm mà cơ sở đó thực hiện;

• Cơ sở có phòng xét nghiệm phải phân công người chịu trách nhiệm về an toàn sinh học;

• Những người khác làm việc trong khu vực xét nghiệm phải được hướng dẫn về an toàn sinh học phù hợp với công việc.

• Nhân viên xét nghiệm, người chịu trách nhiệm về an toàn sinh học phải được tập huấn về an toàn sinh học từ cấp II trở lên.

#### + Điều kiện về quy định thực hành:

- Có quy định ra vào khu vực xét nghiệm;
- Có quy định chế độ báo cáo;
- Có quy trình lưu trữ hồ sơ;
- Có quy trình xét nghiệm phù hợp với kỹ thuật và mẫu bệnh phẩm hoặc vi sinh vật được xét nghiệm;
- Có hướng dẫn sử dụng các trang thiết bị phục vụ hoạt động xét nghiệm;
- Có quy trình về khử nhiễm và xử lý chất thải;
- Có quy định giám sát sức khỏe và y tế.
- Có kế hoạch đào tạo, tập huấn nhân viên làm việc tại khu vực xét nghiệm;
- Có quy định lưu giữ, bảo quản mẫu bệnh phẩm, tác nhân gây bệnh truyền nhiễm tại cơ sở xét nghiệm;
- Có kế hoạch đánh giá nguy cơ xảy ra sự cố an toàn sinh học tại cơ sở xét nghiệm và xây dựng kế hoạch phòng ngừa, xử lý sự cố an toàn sinh học.

**- Các trang thiết bị và y dụng cụ của khoa Vi sinh**

Dưới đây là các TTB thiết yếu của Khoa Vi sinh để đáp ứng nhu cầu thực hiện các xét nghiệm vi sinh cơ bản theo thông tư số 33/2016/TT-BYT, ngày 19/9/2016 về Quy định tổ chức và hoạt động xét nghiệm vi sinh trong bệnh viện ;

TT	Tên dụng cụ, máy móc, trang thiết bị
	Tủ lạnh bảo quản bệnh phẩm
	Tủ lạnh bảo quản hóa chất
	Cân kỹ thuật
	Bình yếm khí dùng nén
	Kính lúp
	Que cấy/Vòng cấy
	Đèn tiệt trùng
	Đèn hay thiết bị khử khuẩn que cấy, vòng cấy khác
	Đĩa Petri
	Giá đỡ ống nghiệm
	Giá đỡ ống nghiệm (nhựa, sắt)
	Máy lắc
	Các dụng cụ thủy tinh phù hợp, cần thiết cho pha chế môi trường (bình, chai...)
	Bình xịt khử khuẩn
	Bình rửa

TT	Tên dụng cụ, máy móc, trang thiết bị
	Giấy thử pH
	Pipet các loại
	Máy ly tâm
	Tủ hấp sạch (dùng cho môi trường)
	Tủ hấp nhiễm (dùng cho rác thải y tế)
	Tủ sấy
	Bể điều nhiệt (bể cách thủy) dùng điện
	Tủ ẩm, không CO <sub>2</sub>
	Kính hiển vi với vật kính ngâm trong dầu
	Lá kính
	Lam kính
	Kính hiển vi
	Hệ thống ELISA (bán tự động, tự động)
	Tủ sạch (tủ hút)
	Tủ an toàn sinh học cấp 2.
	Máy vi tính có nối mạng internet
	Máy in

# AN TOÀN SINH HỌC PHÒNG XÉT NGHIỆM

## 1. Một số khái niệm và thuật ngữ

*An toàn sinh học phòng xét nghiệm (Laboratory Biosafety):* Là thuật ngữ được sử dụng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết để ngăn ngừa những phơi nhiễm không mong muốn hoặc vô tình làm thất thoát tác nhân gây bệnh (TNGB) và độc tố. Trong tài liệu này, an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm được gọi tắt là an toàn sinh học (ATSH).

*An ninh sinh học (Biosecurity):* Là những biện pháp an ninh cho tổ chức hay cá nhân được thiết lập để ngăn chặn sự mất mát, đánh cắp, lạm dụng, đánh tráo hoặc cố tình phóng thích tác nhân gây bệnh và độc tố.

*Hàng rào bảo vệ thứ nhất (Primary Barriers):* Bảo vệ người làm xét nghiệm và môi trường bên trong phòng xét nghiệm; bao gồm tủ ATSH, trang bị bảo hộ cá nhân, cốc ly tâm an toàn...

*Hàng rào bảo vệ thứ hai (Secondary Barriers):* Bảo vệ con người và môi trường bên ngoài phòng xét nghiệm; bao gồm các yếu tố như: Phòng xét nghiệm, cửa tự đóng, bồn rửa tay, dòng khí định hướng, áp suất âm trong phòng xét nghiệm, lọc không khí trước khi thải ra khỏi phòng xét nghiệm, phòng đệm trước khi vào phòng xét nghiệm, nồi hấp tiệt trùng...

## 2. Quy định, hướng dẫn hiện hành liên quan đến an toàn sinh học tại Việt Nam

An toàn sinh học tại phòng xét nghiệm đã được quy định tại Điều 24; 25 và 26 của Luật Phòng chống các bệnh truyền nhiễm (số 03/2007/QH12 ngày 21 tháng 11 năm 2007). Các văn bản dưới Luật cũng đã được ban hành và thực hiện.

Ngày 05 tháng 12 năm 2011, Bộ Y tế ban hành Thông tư số 43/2011/TT-BYT quy định chế độ quản lý mẫu bệnh phẩm bệnh truyền nhiễm. Thông tư này quy định việc thu thập, bảo quản, đóng gói, vận chuyển, lưu giữ, sử dụng, nghiên cứu, trao đổi, tiêu hủy mẫu bệnh phẩm và điều kiện của cơ sở được phép bảo quản, lưu giữ, sử dụng, nghiên cứu, trao đổi, tiêu hủy mẫu bệnh phẩm chứa chất lây nhiễm loại A.

Thông tư số 25/2012/TT-BYT ngày 29 tháng 11 năm 2012 của Bộ Y tế ban hành Quy chuẩn Kỹ thuật quốc gia về thực hành và ATSH tại phòng xét nghiệm, trong đó đưa ra các yêu cầu cụ thể đối với các phòng xét nghiệm ATSH từ cấp I đến cấp IV.

Việc thu gom, vận chuyển và xử lý chất thải hiện nay đáp ứng các quy định trong Thông tư liên tịch số 58/2015/TTLT-BYT-BTNMT của Bộ Y tế và Bộ Tài nguyên và môi trường, ban hành ngày 31 tháng 5 năm 2015.

Danh mục VSV gây bệnh truyền nhiễm theo nhóm nguy cơ và cấp độ ATSH phù hợp kỹ thuật xét nghiệm đã được Bộ Y tế ban hành kèm theo Thông tư số 41/2016/TT-BYT ngày 14 tháng 11 năm 2016. Danh mục này cho phép các phòng xét nghiệm xác

định được nhóm nguy cơ của VSV được tiến hành trong phòng xét nghiệm và cấp độ ATSH của phòng xét nghiệm phù hợp với các kỹ thuật xét nghiệm.

Ngày 01 tháng 7 năm 2016, Chính phủ đã ban hành Nghị định số 103/2016/NĐ-CP thay thế cho Nghị định số 92/2010/NĐ-CP quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm. Nghị định này gồm 7 chương và 32 điều, quy định về các vấn đề sau:

- Phân loại VSV và cơ sở xét nghiệm theo cấp độ ATSH;
- Điều kiện bảo đảm ATSH tại cơ sở xét nghiệm;
- Thẩm quyền, hồ sơ, thủ tục cấp mới, cấp lại, tụt công bố và thu hồi giấy chứng nhận cơ sở xét nghiệm đạt tiêu chuẩn ATSH;
- Kiểm tra ATSH;
- Phòng ngừa, xử lý và khắc phục sự cố ATSH.

Nghị định số 103/2016/NĐ-CP được ban hành cũng đã thay thế toàn bộ nội dung của Thông tư số 29/2012/TT-BYT quy định thủ tục cấp mới, cấp lại giấy chứng nhận phòng xét nghiệm đạt tiêu chuẩn an toàn sinh học và các phần nội dung liên quan đến quy định về cơ sở vật chất, trang thiết bị, nhân sự đối với các phòng xét nghiệm ATSH các cấp độ trong Thông tư số 25/2012/TT-BYT. Các thông tư khác của Bộ Y tế về an toàn sinh học cũng đang được xem xét, chỉnh sửa.

### **3. Phân loại vi sinh vật gây bệnh theo nhóm nguy cơ và cấp độ an toàn sinh học của phòng xét nghiệm**

Để đánh giá mức độ nguy hiểm của các loại VSV gây bệnh truyền nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm và môi trường xung quanh, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP của Chính phủ phân loại vi sinh vật có nguy cơ gây bệnh truyền nhiễm cho người thành 4 nhóm nguy cơ như sau:

**Nhóm nguy cơ 1** là nhóm chưa hoặc ít có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể và cộng đồng bao gồm các loại vi sinh vật chưa phát hiện thấy khả năng gây bệnh cho người;

Ví dụ: *Bacillus subtilis*, *Naegleria gruberi*...

**Nhóm nguy cơ 2** là nhóm có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể ở mức độ trung bình nhưng nguy cơ cho cộng đồng ở mức độ thấp bao gồm các loại vi sinh vật có khả năng gây bệnh nhưng ít gây bệnh nặng cho người, có khả năng lây truyền sang người và có biện pháp phòng, chống lây nhiễm, điều trị hiệu quả trong trường hợp mắc bệnh;

Ví dụ: Virus viêm gan B, vi khuẩn tả, *Salmonella*...

**Nhóm nguy cơ 3** là nhóm có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể cao nhưng nguy cơ cho cộng đồng ở mức độ trung bình bao gồm các loại vi sinh vật có khả năng gây bệnh nặng cho người, có khả năng lây truyền sang người và có biện pháp phòng, chống lây nhiễm, điều trị hiệu quả trong trường hợp mắc bệnh;

Ví dụ: Vi khuẩn lao, virus Hanta, virus cúm A/H5N1, Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS), virus HIV...



**Nhóm nguy cơ 4** là nhóm có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể và cộng đồng ở mức độ cao bao gồm các loại vi sinh vật có khả năng gây bệnh nặng cho người, có khả năng lây truyền sang người và chưa có biện pháp phòng, chống lây nhiễm, điều trị hiệu quả trong trường hợp mắc bệnh.

Ví dụ: Virus Ebola, virus Variola...

Các cơ sở xét nghiệm được phân loại thành 4 cấp độ an toàn sinh học như sau:

**Cơ sở xét nghiệm an toàn sinh học cấp I** được thực hiện xét nghiệm đối với các loại vi sinh vật thuộc nhóm 1 và các sản phẩm từ vi sinh vật thuộc nhóm khác nhưng đã được xử lý và không còn khả năng gây bệnh;

**Cơ sở xét nghiệm an toàn sinh học cấp II** được thực hiện xét nghiệm đối với các loại vi sinh vật thuộc nhóm 1 và nhóm 2 và các sản phẩm từ vi sinh vật thuộc nhóm 3, nhóm 4 nhưng đã được xử lý phù hợp với điều kiện của cơ sở xét nghiệm an toàn sinh học cấp II;

**Cơ sở xét nghiệm an toàn sinh học cấp III** được thực hiện xét nghiệm đối với các loại vi sinh vật thuộc nhóm 1, nhóm 2 và nhóm 3 và các sản phẩm từ vi sinh vật thuộc nhóm 4 nhưng đã được xử lý phù hợp với điều kiện của cơ sở xét nghiệm an toàn sinh học cấp III;

**Cơ sở xét nghiệm an toàn sinh học cấp IV** được thực hiện xét nghiệm đối với các loại vi sinh vật thuộc cả 4 nhóm nguy cơ.

Để xác định cấp độ an toàn sinh học phù hợp, các phòng xét nghiệm cần dựa vào nhóm nguy cơ của các VSV và loại kỹ thuật xét nghiệm được tiến hành. Thông tư số 41/2016/TT-BYT của Bộ Y tế cung cấp thông tin chi tiết để xác định cấp độ ATSH phù hợp cho từng phòng xét nghiệm.

#### **4. Các yêu cầu về an toàn sinh đối với phòng xét nghiệm**

Để phục vụ các phòng xét nghiệm làm việc với các bệnh phẩm có hoặc nghi ngờ chứa tác nhân gây bệnh cho người, trong tài liệu này, chúng tôi tập trung giới thiệu các yêu cầu đối với phòng xét nghiệm ATSH cấp II như sau:

##### **a. Cơ sở vật chất**

- Phải riêng biệt với các phòng khác của cơ sở xét nghiệm;
- Sàn, tường, bàn xét nghiệm phải bằng phẳng, không thấm nước, chịu được nhiệt và các loại hóa chất ăn mòn và dễ cọ rửa vệ sinh;
- Có biển báo nguy hiểm sinh học trên cửa ra vào của khu vực xét nghiệm.
- Có bồn nước rửa tay, dụng cụ rửa mắt khẩn cấp, hộp sơ cứu;
- Có điện với hệ thống điện tiếp đất và có nguồn điện dự phòng;
- Có nước sạch, đường ống cấp nước trực tiếp cho khu vực xét nghiệm phải có thiết bị chống chảy ngược để bảo vệ hệ thống nước công cộng;
- Có các thiết bị phòng, chống cháy nổ;

- Có đủ ánh sáng để thực hiện xét nghiệm.

- Có hệ thống thu gom, xử lý hoặc trang thiết bị xử lý nước thải. Đối với cơ sở xét nghiệm đang hoạt động trước ngày Nghị định này có hiệu lực thi hành phải có kết quả xét nghiệm nước thải đạt quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về môi trường trước khi thải vào nơi chứa nước thải chung;

### **b. Trang thiết bị**

- Các thiết bị xét nghiệm phù hợp với kỹ thuật và mẫu bệnh phẩm hoặc vi sinh vật được xét nghiệm;

- Có tủ an toàn sinh học;

- Có thiết bị hấp chất thải y tế lây nhiễm hoặc thiết bị khử khuẩn;

- Có các bao bì, dụng cụ, thiết bị lưu chứa chất thải y tế theo quy định;

- Có thiết bị để khử trùng dụng cụ và bệnh phẩm;

- Các trang thiết bị bảo hộ cá nhân phù hợp với loại kỹ thuật xét nghiệm thực hiện tại cơ sở xét nghiệm an toàn sinh học cấp II.

### **c. Nhân sự**

- Số lượng nhân viên: Có ít nhất 02 nhân viên xét nghiệm. Nhân viên trực tiếp thực hiện xét nghiệm vi sinh vật (sau đây gọi tắt là nhân viên xét nghiệm) phải có văn bằng, chứng chỉ đào tạo phù hợp với loại hình xét nghiệm mà cơ sở đó thực hiện;

- Cơ sở có phòng xét nghiệm phải phân công người chịu trách nhiệm về ATSH;

- Nhân viên xét nghiệm, người chịu trách nhiệm về an toàn sinh học phải được tập huấn về an toàn sinh học từ cấp II trở lên;

- Những người khác làm việc trong khu vực xét nghiệm phải được hướng dẫn về an toàn sinh học phù hợp với công việc.

### **d. Thực hành**

- Có và tuân thủ các quy định/quy trình/hướng dẫn sau:

+ Có quy định ra vào khu vực xét nghiệm;

+ Có quy định chế độ báo cáo;

+ Có quy trình lưu trữ hồ sơ;

+ Có quy trình xét nghiệm phù hợp với kỹ thuật và mẫu bệnh phẩm hoặc vi sinh vật được xét nghiệm;

+ Có hướng dẫn sử dụng các trang thiết bị phục vụ hoạt động xét nghiệm;

+ Có quy trình về khử nhiễm và xử lý chất thải;

+ Có quy định giám sát sức khỏe và y tế;

- + Có kế hoạch đào tạo, tập huấn nhân viên làm việc tại khu vực xét nghiệm;
- + Có quy định lưu giữ, bảo quản mẫu bệnh phẩm, tác nhân gây bệnh truyền nhiễm tại cơ sở xét nghiệm;
- + Có kế hoạch đánh giá nguy cơ xảy ra sự cố an toàn sinh học tại cơ sở xét nghiệm và xây dựng kế hoạch phòng ngừa, xử lý sự cố an toàn sinh học.
  - Không hút pipet bằng miệng;
  - Không dùng bơm, kim tiêm để thay thế pipet hoặc vào bất kỳ mục đích khác ngoài mục đích tiêm, truyền hay hút dịch từ động vật thí nghiệm; bơm kim tiêm sau khi sử dụng phải được cho vào hộp đựng vật sắc nhọn chuyên biệt, không uốn cong, bẻ gãy, đập lại nắp kim tiêm hoặc tháo kim tiêm ra khỏi bơm tiêm;
  - Rửa sạch vùng da tiếp xúc với các chất hóa học, rửa tay trước khi rời phòng xét nghiệm;
  - Mặc áo bảo hộ phòng xét nghiệm, đi giày, dép kín mũi chân khi làm việc trong phòng xét nghiệm, không mặc quần áo bảo hộ phòng xét nghiệm ra khu vực công cộng;
  - Không để chung quần áo bảo hộ phòng xét nghiệm với quần áo thông thường;
  - Không mang đồ dùng cá nhân, thực phẩm vào phòng xét nghiệm;
  - Không sử dụng thiết bị phòng xét nghiệm để cất trữ hoặc chế biến thực phẩm;
  - Không ăn uống, hút thuốc, cạo râu và sử dụng mỹ phẩm trong phòng xét nghiệm;
  - Phải khử nhiễm bề mặt bàn làm việc ngay sau khi kết thúc xét nghiệm, vào cuối ngày làm việc và khi có sự cố tràn, đổ mẫu bệnh phẩm chứa TNGB;
  - Phân loại, vận chuyển và xử lý chất thải theo quy định tại Thông tư liên tịch số 58/2015/TTLT-BYT-BTNMT của Bộ Y tế và Bộ Tài nguyên và môi trường.

## 5. Đánh giá nguy cơ trong phòng xét nghiệm

Theo hướng dẫn của WHO, đánh giá nguy cơ là vấn đề cốt lõi của ATSH. Thực hiện đánh giá nguy cơ cũng là yêu cầu bắt buộc về thực hành đối với các phòng xét nghiệm ATSH cấp II trở lên. Kết quả từ quá trình đánh giá nguy cơ sẽ giúp ích cho việc lựa chọn cấp độ ATSH phù hợp của phòng xét nghiệm, xác định các biện pháp về thực hành vi sinh, trang thiết bị và cơ sở vật chất cần thiết để phòng tránh lây nhiễm xảy ra trong phòng xét nghiệm. Để hiểu hơn về quá trình này, một số khái niệm cần được hiểu như sau:

*Nguy hiểm (Hazard):* Là yếu tố có khả năng gây hại.

*Nguy cơ (Risk):* Là khả năng xảy ra một sự cố liên quan đến một môi nguy hiểm gây hậu quả.

*Khả năng xảy ra (Likelihood):* Xác suất xảy ra của một sự cố nào đó.

*Hậu quả (Consequence):* Mức độ trầm trọng của một sự cố.

*Đánh giá nguy cơ (Risk assessment):* Là quá trình đánh giá nguy cơ do một mối nguy hiểm gây ra trong một điều kiện cụ thể và quyết định nguy cơ đó có chấp nhận được hay không.

Quá trình đánh giá nguy cơ cần có sự tham gia của người phụ trách phòng xét nghiệm, phụ trách ATSH và nhân viên phòng xét nghiệm, những người hiểu biết về đặc điểm của TNGB, quy trình xét nghiệm, cơ sở vật chất, trang thiết bị của phòng xét nghiệm. Phòng xét nghiệm cần phải thực hiện đánh giá nguy cơ định kỳ theo kế hoạch hoặc khi có sự thay đổi về quy trình xét nghiệm, tác nhân gây bệnh, cơ sở vật chất, trang thiết bị, nhân sự hoặc khi xảy ra sự kiện không mong muốn.

Để tiến hành đánh giá nguy cơ trong phòng xét nghiệm, cần thu thập đầy đủ các thông tin và tài liệu liên quan đến phòng xét nghiệm bao gồm:

- Các quy trình xét nghiệm, hướng dẫn sử dụng trang thiết bị trong phòng xét nghiệm;
- Quy định, hướng dẫn áp dụng tại phòng xét nghiệm;
- Thông tin về các loại tác nhân gây bệnh, hóa chất sử dụng trong phòng xét nghiệm;
- Kết quả đánh giá nguy cơ trước đây (nếu có)...

Sau khi đã thu thập đủ các thông tin cần thiết, quá trình đánh giá nguy cơ được thực hiện theo 3 bước như sau:

### **Bước 1. Xác định nguy hiểm**

Nguy hiểm trong phòng xét nghiệm là các yếu tố có khả năng gây hại đến con người, động vật và môi trường xung quanh. Có rất nhiều mối nguy hiểm trong phòng xét nghiệm có sử dụng tác nhân gây bệnh. Các mối nguy hiểm này được chia thành 3 nhóm chính bao gồm:

- Nguy hiểm sinh học là vật liệu chứa tác nhân gây bệnh như mẫu bệnh phẩm, ống đựng mẫu bệnh phẩm, dụng cụ xét nghiệm, chất thải lây nhiễm...
- Nguy hiểm vật lý có thể là điện, hỏa hoạn, cháy nổ, nhiệt, hơi nóng, hơi lạnh, áp suất...
- Nguy hiểm hóa học có thể là các loại hóa chất độc hại, chất phóng xạ nguy hiểm đối với sức khỏe con người và môi trường.

Nguy hiểm sinh học là mối nguy hiểm được quan tâm nhất trong phòng xét nghiệm. Hiểu biết về đặc điểm của tác nhân gây bệnh là rất cần thiết trong việc xác định các mối nguy hiểm sinh học. Một trong những đặc điểm quan trọng cần xem xét trong quá trình đánh giá nguy cơ là nhóm nguy cơ của tác nhân gây bệnh.

## Bước 2. Đánh giá nguy cơ

Nguy cơ được xác định dựa trên từng mối nguy hiểm cụ thể. Mức độ nguy cơ phụ thuộc vào Khả năng xảy ra và Hậu quả của từng sự việc và được thể hiện bằng công thức sau:

$$\text{Nguy cơ} = \text{Khả năng xảy ra} \times \text{Hậu quả}$$

Ma trận đánh giá nguy cơ được sử dụng để đánh giá và phân loại mức độ của nguy cơ xác định được. Ma trận đánh giá nguy cơ là một bảng, thể hiện sự tương tác giữa các mức độ của Hậu quả và khả năng xảy ra khác nhau, tạo thành mức độ nguy cơ. Có nhiều loại ma trận đánh giá nguy cơ được chia phụ thuộc vào việc phân chia mức độ của Hậu quả và khả năng xảy ra. Ví dụ như ma trận nguy cơ 3x3, 5x5... Dưới đây là ma trận đánh giá nguy cơ đơn giản nhất (ma trận 3x3).

**Bảng 1.** Ma trận đánh giá nguy cơ 3x3

Khả năng xảy ra	Hậu quả		
	Nhẹ	Trung bình	Nặng
Thường xuyên	Trung bình	Cao	Cao
Có khả năng	Thấp	Trung bình	Cao
Hiếm khi	Thấp	Thấp	Trung bình

Trong ma trận đánh giá nguy cơ 3x3, khả năng xảy ra được chia thành 3 mức độ: thường xuyên, có khả năng và hiếm khi. Hậu quả được chia thành 3 mức độ: nhẹ, trung bình, nặng. Việc phân loại nguy cơ thành các mức độ thấp, trung bình, cao được quyết định bởi khả năng xảy ra và Hậu quả dựa trên bảng ma trận này.

Trước khi tiến hành đánh giá nguy cơ, nhóm đánh giá cần mô tả và thống nhất về cách phân loại Khả năng xảy ra và Hậu quả. Việc phân loại Khả năng xảy ra và Hậu quả có thể khác nhau, phụ thuộc vào tình hình thực tế của các phòng xét nghiệm. Dưới đây là ví dụ về các mức độ của Khả năng xảy ra và Hậu quả (bảng 2, 3).

**Bảng 2.** Ví dụ về phân loại và mô tả mức độ của Khả năng xảy ra

Khả năng xảy ra	Mô tả	Tần suất xảy ra
Hiếm khi	Sự kiện chỉ xảy ra trong một số trường hợp đặc biệt	Xảy ra ít hơn 1 lần trong 10 năm
Có khả năng	Sự kiện có khả năng xảy ra trong hầu hết các trường hợp	Xảy ra ít nhất 1 lần trong 5 năm
Thường xuyên	Sự kiện dự kiến sẽ xảy ra trong hầu hết các trường hợp	Xảy ra ít nhất 1 lần trong 1 năm

**Bảng 3.** Ví dụ về phân loại và mô tả mức độ của Hậu quả

Hậu quả	Mô tả
Nhẹ	Tai nạn nhỏ, sự cố tràn, đổ dung dịch chứa TNGB, hóa chất, lỗi thiết bị, hệ thống, có thể tự giải quyết mà không cần hỗ trợ
Trung bình	Tai nạn gây ra thương tích nhẹ hoặc bị phơi nhiễm và yêu cầu hỗ trợ từ bên ngoài
Nặng	Tai nạn nghiêm trọng, bị lây nhiễm, có thể ảnh hưởng đến tính mạng con người

Bên cạnh cách phân loại Khả năng xảy ra và Hậu quả như trên, chúng ta có thể áp dụng các khái niệm Khả năng xảy ra tương đối (Relative likelihood), Hậu quả tương đối (Relative consequence) của một tai nạn, sự cố ATSH. Nghĩa là, sau khi liệt kê các tai nạn, sự cố có thể xảy ra, chúng ta so sánh Khả năng xảy ra và Hậu quả của chúng với nhau để quyết định việc phân loại theo các mức độ.

Việc đánh giá mức độ của một nguy cơ nhằm xác định nguy cơ đó có chấp nhận được hay không và thứ tự ưu tiên giải quyết nguy cơ thông qua việc thực hiện các biện pháp kiểm soát phù hợp. Nhóm đánh giá nguy cơ cần phải thống nhất việc xác định các nguy cơ có thể chấp nhận được. Bảng 4 là một ví dụ về các mức độ nguy cơ: thấp, trung bình và cao.

**Bảng 4.** Ví dụ về phân loại và mô tả mức độ nguy cơ

Mức độ	Phân loại mức độ nguy cơ	Mô tả
1	Thấp	Nguy cơ có thể chấp nhận được nếu được quản lý theo quy trình quản lý sẵn có và được giám sát thường xuyên
2	Trung bình	Nguy cơ có thể chấp nhận được ở mức độ vừa phải, có thể thực hiện thêm các biện pháp kiểm soát nguy cơ khác
3	Cao	Nguy cơ không thể chấp nhận được, yêu cầu thực hiện ngay các biện pháp kiểm soát nguy cơ

### **Bước 3. Kiểm soát nguy cơ**

Việc kiểm soát nguy cơ bao gồm xây dựng, thực hiện và quản lý các biện pháp kiểm soát nhằm giảm mức độ nguy cơ. Các biện pháp kiểm soát nguy cơ có thể phân loại thành 5 nhóm biện pháp chính bao gồm: cơ sở vật chất, trang thiết bị, nhân sự, thực hành và phòng ngừa, xử lý sự cố an toàn sinh học. Các biện pháp kiểm soát này sẽ được đề cập chi tiết trong các bài khác của tài liệu này.

## 6. Trang thiết bị an toàn trong phòng xét nghiệm

### 6.1. Trang bị bảo hộ cá nhân (BHCN)

Trang bị BHCN là hàng rào bảo vệ thứ nhất giúp bảo vệ người làm xét nghiệm tránh khỏi nguy cơ lây nhiễm TNGB trong phòng xét nghiệm, đồng thời giảm thiểu các thương tích do va chạm vật lý hay tiếp xúc hóa chất gây ra. Các nguyên tắc khi sử dụng trang bị BHCN trong phòng xét nghiệm như sau:

- Trang bị BHCN giúp làm giảm nhưng không loại bỏ hoàn toàn nguy cơ lây nhiễm TNGB. Việc sử dụng trang bị BHCN không thể thay thế được một số biện pháp kiểm soát nhiễm trùng cơ bản như rửa tay, sát khuẩn tay;

- Cần tiến hành đánh giá nguy cơ để xác định các loại trang bị BHCN phù hợp với từng loại công việc cụ thể;

- Trang bị đầy đủ về chủng loại và kích cỡ các loại BHCN thiết yếu. Không sử dụng các trang bị BHCN bị lỗi, bị hỏng hoặc hết hạn sử dụng;

- Người sử dụng trang bị BHCN phải được đào tạo và có thể sử dụng thành thạo các loại trang bị BHCN.

Các loại trang bị bảo hộ cá nhân cơ bản trong các phòng xét nghiệm ATSH cấp II bao gồm các loại sau:

#### a. Găng tay

Găng tay được sử dụng để bảo vệ người làm xét nghiệm khỏi nguy cơ tiếp xúc trực tiếp với mẫu bệnh phẩm, các bề mặt, dụng cụ nghi ngờ chứa TNGB hoặc hóa chất độc hại. Găng tay được sử dụng trong phòng xét nghiệm thường là găng tay latex, nitrile hoặc găng tay cao su. Tùy thuộc vào loại công việc khác nhau mà lựa chọn găng tay cho phù hợp. Đối với công việc xét nghiệm với TNGB thì có thể dùng loại găng tay latex hoặc nitrile, dùng một lần. Khi tiến hành vệ sinh, khử nhiễm phòng xét nghiệm, trang thiết bị, dụng cụ xét nghiệm... thì cần sử dụng găng tay cao su dày. Trường hợp làm việc với hóa chất ăn mòn thì phải sử dụng loại găng tay chịu được hóa chất. Ngoài ra, đối với một số công việc có nguy cơ cao, nên đeo hai lớp găng tay để đảm bảo an toàn.

Một số lưu ý khi sử dụng găng tay:

- Sử dụng găng tay có kích cỡ phù hợp với người sử dụng;
- Nên đeo găng tay trùm ra ngoài cổ tay áo bảo hộ;
- Khi găng tay đã nhiễm bẩn, cần hạn chế sờ vào các bề mặt khác như công tắc điện, tay nắm cửa...

- Găng tay dùng một lần không nên rửa hay giặt để sử dụng lại;

- Rửa tay ngay với xà phòng và nước sau khi tháo găng tay;

- Thực hiện cởi bỏ găng tay (hình 1) theo cách sau:

- + Dùng tay vẫn đeo găng để cởi găng tay bên kia bằng cách kéo từ trên xuống để lộn mặt trong của găng tay này ra ngoài;

- + Tay vẫn đeo găng cầm lấy găng tay vừa được cởi ra;
- + Dùng tay vừa được cởi găng để cởi nốt găng tay còn lại sao cho găng tay này trùm lấy găng tay vừa được cởi và mặt trong của nó cũng được lộn ra ngoài. Lưu ý không để tay tiếp xúc trực tiếp với mặt ngoài của găng tay;
- + Bỏ găng tay vừa cởi vào túi đựng chất thải lây nhiễm;
- + Rửa tay bằng xà phòng và nước sạch hay sát khuẩn tay bằng dung dịch sát khuẩn nhanh.



**Hình 1.** Cách cởi bỏ găng tay

### ***b. Khẩu trang***

Khẩu trang được sử dụng giúp bảo vệ người làm việc trong phòng xét nghiệm tránh khỏi nguy cơ lây nhiễm với các TNGB qua đường hô hấp. Sử dụng khẩu trang trong những thao tác có khả năng tạo ra các hạt khí dung chứa TNGB. Thông thường, nhân viên xét nghiệm sử dụng khẩu trang y tế dùng 1 lần khi thực hiện các thao tác xét nghiệm trong phòng xét nghiệm ATSH cấp II. Cách sử dụng khẩu trang y tế (loại có dây vòng qua tai) như sau:

- Cách đeo khẩu trang:

- + Dùng hai tay đưa khẩu trang trùm lên mũi và miệng, mặt màu trắng của khẩu trang áp sát vào phía trong, mặt màu xanh ra phía ngoài, viền mũi (có đường gân cứng) hướng lên trên.
- + Dùng một tay kéo dây vòng qua tai.
- + Dùng đầu ngón tay của hai tay đè viền mũi khẩu trang cho khít với cánh mũi.
- + Giữ mép trên của khẩu trang, kéo mép dưới của khẩu trang sao cho trùm lên cằm.



- Cách cởi khẩu trang:

+ Dùng tay đã cởi găng để cởi dây đeo khẩu trang. Lưu ý không chạm tay vào mặt trước khẩu trang.

+ Gập mặt ngoài của khẩu trang vào trong và cho vào túi đựng chất thải lây nhiễm.

+ Rửa tay bằng xà phòng và nước sạch hay sát khuẩn tay bằng dung dịch sát khuẩn nhanh.

### ***c. Quần áo bảo hộ***

Quần áo bảo hộ giúp bảo vệ người mặc tránh bị lây nhiễm với TNGB, hóa chất lên cơ thể hay quần áo bình thường. Tùy từng trường hợp cụ thể để lựa chọn các loại quần áo bảo hộ phù hợp. Sử dụng áo blouse khi tiến hành hầu hết các thao tác trong phòng xét nghiệm ATSH cấp II. Một số thao tác xét nghiệm có nguy cơ cao cần sử dụng thêm 1 lớp áo choàng hoặc bộ quần áo chống dịch bên ngoài áo blouse. Áo choàng sử dụng trong phòng xét nghiệm nên là áo dài tay, có bo ở cổ tay, có độ dài phù hợp với người mặc. Một số lưu ý khi sử dụng quần áo bảo hộ trong phòng xét nghiệm như sau:

- Bố trí chỗ treo áo choàng phòng xét nghiệm ở bên trong, gần cửa ra vào phòng xét nghiệm.

- Luôn mặc áo bảo hộ phòng xét nghiệm khi làm việc trong phòng xét nghiệm

- Không mặc quần áo bảo hộ phòng xét nghiệm ra khu vực công cộng.

- Không để chung quần áo bảo hộ phòng xét nghiệm với quần áo thông thường.

### ***d. Giày, dép***

Giày, dép giúp bảo vệ nhân viên phòng xét nghiệm tránh nhiễm TNGB hay hóa chất do đổ, tràn, văng bắn các dung dịch này. Nên trang bị giày, dép riêng để đi trong phòng xét nghiệm. Dép đi trong phòng xét nghiệm phải kín mũi chân để đảm bảo hiệu quả bảo vệ tốt nhất. Một số lưu ý khi sử dụng giày, dép trong phòng xét nghiệm:

- Luôn đi giày, dép kín mũi chân khi làm việc trong phòng xét nghiệm.

- Nên bố trí giá/khu vực để giày, dép riêng cho giày, dép đi trong phòng xét nghiệm và ngoài phòng xét nghiệm.

### ***e. Mũ trùm đầu***

Mũ trùm đầu được sử dụng để bảo vệ phần đầu, tóc và tai tránh khỏi lây nhiễm TNGB trong mẫu bệnh phẩm. Không chỉ có tác dụng bảo vệ người làm việc, sử dụng mũ trùm đầu còn có tác dụng tránh lây nhiễm từ người làm xét nghiệm lên mẫu xét nghiệm. Ngoài ra, mũ trùm đầu còn giúp tránh những vương vãi do tóc gây ra trong quá trình làm việc.

Trong các phòng xét nghiệm, loại mũ được sử dụng chủ yếu là mũ giấy dùng một lần. Ngoài ra cũng có thể sử dụng loại mũ vải dùng nhiều lần, tuy nhiên phải khử nhiễm và giặt, là đúng cách trước khi tái sử dụng.

### ***f. Kính, tấm che mặt***

Kính, tấm che mặt được sử dụng để tránh TNGB hay hóa chất độc hại bắn vào mắt, mặt.

Tùy thuộc vào mức độ nguy hiểm của công việc mà lựa chọn các trang bị bảo vệ mắt, mặt cho phù hợp và đảm bảo an toàn. Trong trường hợp tiến hành các thao tác có khả năng tạo ra các giọt dung dịch hay hạt khí dung chứa TNGB thì sử dụng kính bảo hộ là phù hợp. Trong trường hợp có thể xảy ra nguy hiểm do đánh đổ hoặc văng, bắn hóa chất độc hại thì có thể dùng tấm che mặt.

Kính, tấm che mặt phải được khử nhiễm bằng phương pháp phù hợp trước khi tái sử dụng.

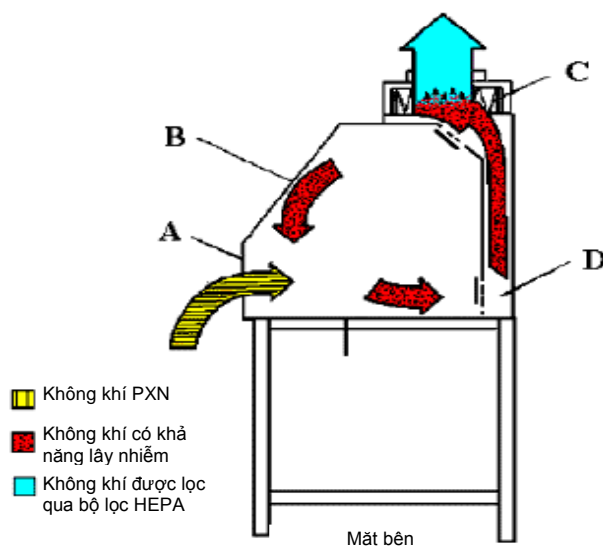
## **6.2. Tủ an toàn sinh học**

Tủ an toàn sinh học là thiết bị đảm bảo ATSH quan trọng của một phòng xét nghiệm vi sinh. Tủ ATSH đóng vai trò là hàng rào bảo vệ đầu tiên giúp ngăn chặn các TNGB phát tán ra ngoài môi trường không khí.

Bộ lọc hiệu suất cao (High Efficiency Particulate Air - HEPA) là một bộ phận quan trọng của tủ ATSH. Bộ lọc này có tác dụng giữ lại các hạt khí dung chứa TNGB từ luồng khí lưu thông qua nó. Theo tiêu chuẩn của Mỹ, bộ lọc HEPA phải chặn được 99,97% các phần tử trong không khí có đường kính 0,3 $\mu$ m và chịu được áp suất của dòng khí lưu thông qua là 300Pa. Với thiết kế đặc thù, bộ lọc HEPA còn có thể lọc được các hạt có kích thước lớn hơn hoặc nhỏ hơn 0,3 $\mu$ m với hiệu suất lọc lớn hơn 99,97%.

Hiện nay, tủ ATSH được chia ra thành 3 cấp: cấp I, cấp II và cấp III tùy theo thiết kế của tủ.

### ***a. Tủ an toàn sinh học cấp I***



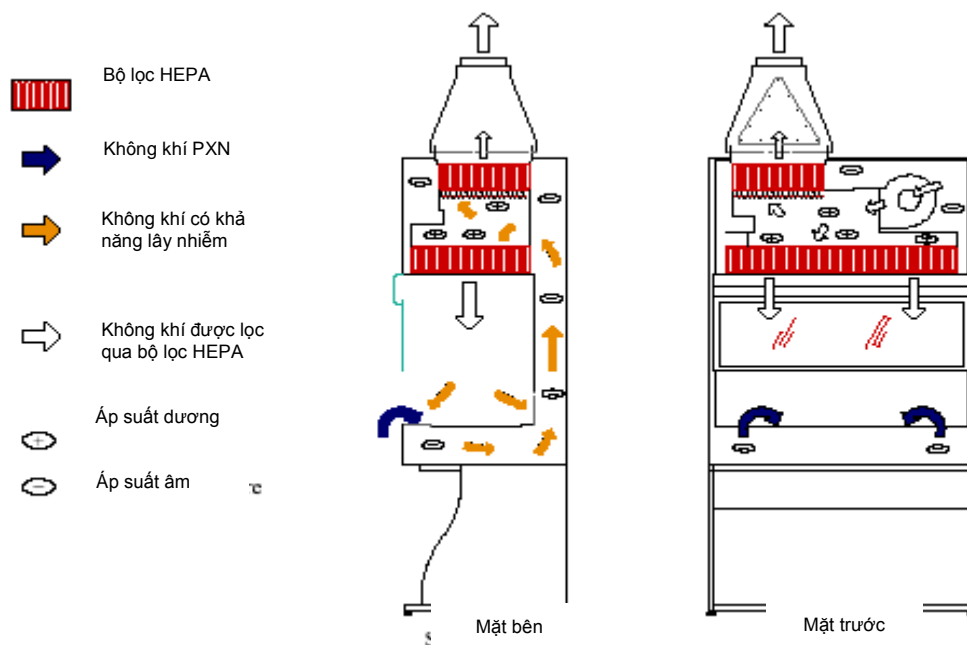
**Hình 1.** Tủ an toàn sinh học cấp I

Không khí trong phòng được hút vào qua cửa phía trước với tốc độ tối thiểu 0,38m/s, đi qua bề mặt làm việc và thoát ra ngoài qua ống thải khí. Dòng khí đi từ hướng người làm việc vào trong tủ ATSH, do đó tránh phát tán các hạt khí dung phát sinh do các thao tác xét nghiệm bên trong tủ ra bên ngoài, giúp bảo vệ người làm xét nghiệm. Không khí từ trong tủ ATSH trước khi thải ra ngoài được lọc qua bộ lọc HEPA, do đó giúp bảo vệ môi trường xung quanh. Ngoài ra, với thiết kế thải khí trực tiếp ra bên ngoài phòng xét nghiệm qua ống thải khí nên tủ ATSH cũng có thể được dùng để làm việc với các hóa chất độc dễ bay hơi. Do không khí cấp cho khu vực làm xét nghiệm của tủ ATSH là không khí từ PXN, không được lọc qua bộ lọc HEPA nên tủ ATSH cấp I không bảo vệ được mẫu xét nghiệm.

### ***b. Tủ an toàn sinh học cấp II***

Tủ ATSH cấp II có thiết kế chuyên biệt giúp bảo vệ người làm xét nghiệm, mẫu xét nghiệm và môi trường xung quanh. Tủ ATSH cấp II được chia thành hai loại là tủ ATSH cấp II A và cấp II B.

#### *Tủ an toàn sinh học cấp II A*



**Hình 2.** Tủ an toàn sinh học cấp II A

Quạt hút hút không khí phòng vào tủ qua tấm lưới ở phía trước bề mặt làm việc của tủ. Tốc độ dòng không khí này tại cửa làm việc của tủ phải đạt tối thiểu 0,38m/s. Sau đó, dòng không khí được thổi lên khoảng trống giữa HEPA cấp và HEPA thải và chia làm hai phần. Phần thứ nhất được thổi qua bộ lọc HEPA cấp và đi thẳng xuống bề mặt làm việc. Dòng không khí đến cách bề mặt làm việc khoảng 6 - 18cm thì chia ra thành hai phần, một phần đi qua tấm lưới phía trước và phần còn lại đi qua tấm lưới phía sau của bề mặt làm việc tuần hoàn trở lại quạt hút. Các hạt khí dung được tạo ra

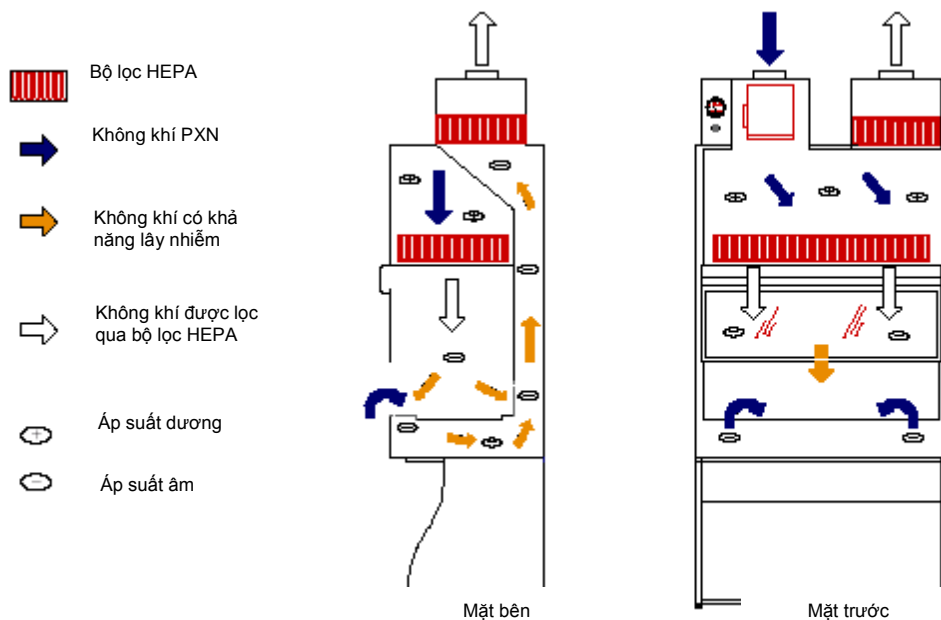
phía trên bề mặt làm việc ngay lập tức bị hút theo hai dòng không khí này nên không bị lọt ra ngoài tủ. Phần thứ hai được thổi qua HEPA thải ở phía trên của tủ.

Tùy thuộc vào kích thước bộ lọc, khoảng 70% không khí tuần hoàn trở lại qua bộ lọc HEPA cấp vào khu vực làm việc, 30% còn lại đi qua bộ lọc HEPA thải ra ngoài.

Không khí thải từ tủ ATSH cấp II A sẽ được thải vào PXN. Việc tuần hoàn khí thải vào phòng có ưu điểm là tiết kiệm chi phí cho phòng xét nghiệm bởi vì không khí đã được làm nóng hay làm lạnh không bị thải ra ngoài môi trường. Tuy nhiên, loại tủ này không được sử dụng để thao tác với hóa chất bay hơi hoặc chất phóng xạ do bộ lọc HEPA không có khả năng lọc được hơi hóa chất độc hại.

Tủ ATSH cấp II A được chia thành 2 loại là cấp II A1 và cấp II A2. 2 loại tủ này khác nhau chủ yếu ở vị trí quạt hút không khí.

### Tủ an toàn sinh học cấp II B

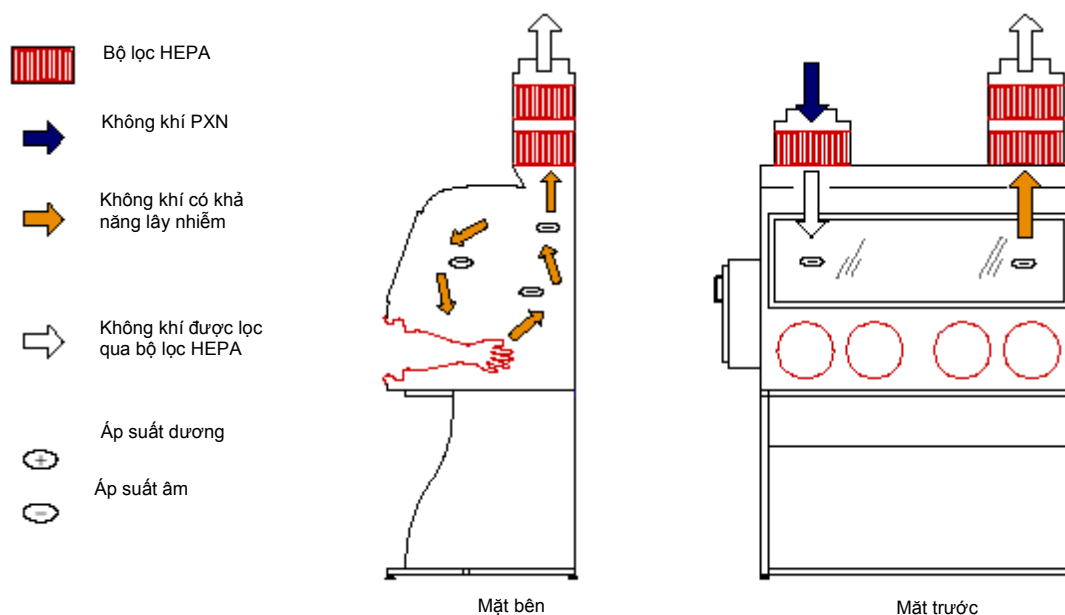


**Hình 3.** Tủ an toàn sinh học cấp II B

Điểm khác biệt cơ bản nhất giữa tủ ATSH cấp II A và II B là tủ ATSH cấp II A thổi khí trực tiếp vào trong phòng xét nghiệm, trong khi đó, tủ cấp II B thổi khí ra khỏi phòng xét nghiệm qua ống nối cứng. Với cấu tạo này nên tủ ATSH cấp II B có thể sử dụng để làm việc với lượng nhỏ hóa chất độc hại, dễ bay hơi.

Tủ ATSH cấp II B được chia thành 2 loại là cấp II B1 và II B2. 2 loại tủ này khác nhau ở một số điểm như tỉ lệ khí được tuần hoàn, vị trí khí cấp vào tủ.

### c. Tủ an toàn sinh học cấp III



**Hình 4.** Tủ an toàn sinh học cấp III

Tủ an toàn sinh học cấp III được thiết kế để bảo vệ tối đa cho nhân viên phòng xét nghiệm và môi trường xung quanh, thường dùng để làm xét nghiệm TNGB truyền nhiễm ở nhóm nguy cơ 4. Tủ ATSH cấp III là tủ kín khí, với thiết kế luôn duy trì áp suất âm bên trong tủ. Vật liệu được đưa vào bên trong tủ hoặc đưa ra khỏi tủ thông qua hộp vận chuyển mẫu hoặc nồi hấp hai cửa. Nhân viên phòng xét nghiệm thực hiện thao tác xét nghiệm bên trong tủ thông qua găng tay cao su dày, gắn ở cửa phía trước tủ.

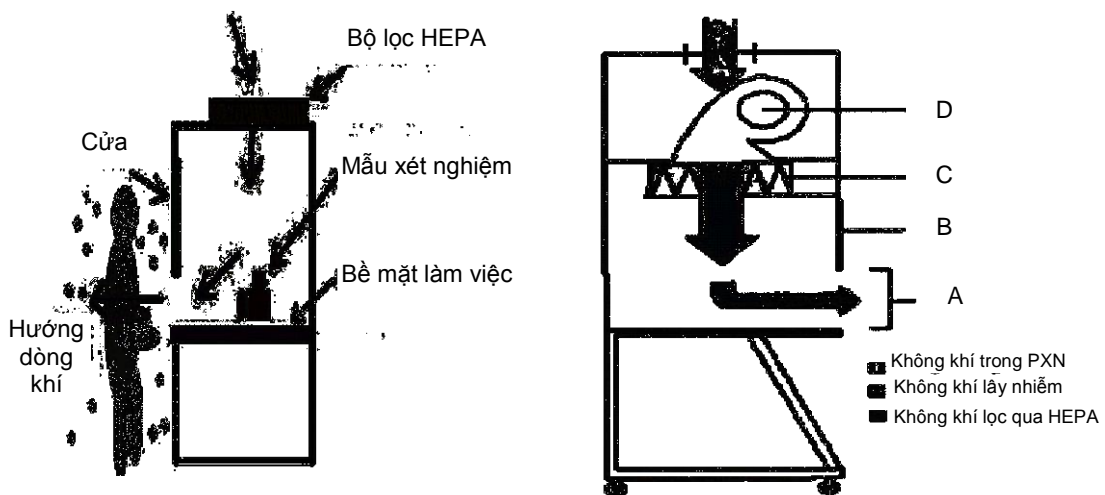
Sự khác biệt của các loại tủ ATSH cấp I, II, III như sau:

**Bảng 5.** Sự khác nhau giữa các loại tủ an toàn sinh học cấp I, II và III

Tủ ATSH	Tốc độ dòng khí hút vào tại cửa trước (m/s)	Lưu lượng khí (%)		Hệ thống thải khí
		Tái tuần hoàn	Thải	
Cấp I	0,38	0	100	Thải ra ngoài phòng (hard duct)
Cấp II A1	0,38 – 0,51	70	30	Thải vào phòng hoặc có hệ thống hút khí thải ra ngoài phòng (thimble)
Cấp II A2	0,51	70	30	Thải vào phòng hoặc có hệ thống hút khí thải ra ngoài phòng (thimble)

Tủ ATSH	Tốc độ dòng khí hút vào tại cửa trước (m/s)	Lưu lượng khí (%)		Hệ thống thải khí
		Tái tuần hoàn	Thải	
Cấp II B1	0,51	30	70	Thải ra ngoài phòng (hard duct)
Cấp II B2	0,51	0	100	Thải ra ngoài phòng (hard duct)
Cấp III	NA	0	100	Thải ra ngoài phòng (hard duct)

**d. Phân biệt tủ sạch (clean bench, laminar flow) và tủ an toàn sinh học**



**Hình 5. Tủ sạch (Clean bench)**

A: Khe hở phía trước; B: Khung kính chắn phía trước; C: Bộ lọc HEPA; D: Quạt hút

Không khí cấp vào tủ sạch được lọc qua bộ lọc HEPA và thổi qua bề mặt làm việc của tủ, giúp bảo vệ mẫu xét nghiệm khỏi nhiễm với các tác nhân trong không khí phòng xét nghiệm. Tủ sạch được sử dụng trong các trường hợp như chuẩn bị môi trường nuôi cấy, nuôi cấy mô tế bào thực vật, pha trộn hóa chất PCR... Vì không khí sau khi đi qua bề mặt làm việc của tủ sẽ thổi trực tiếp về phía người làm việc nên tủ không bảo vệ người làm xét nghiệm. Do đó, không sử dụng tủ sạch để thao tác với vật liệu chứa TNGB, hóa chất độc hại và chất phóng xạ.

Lắp đặt tủ ATSH đúng vị trí trong phòng xét nghiệm sẽ giúp đạt hiệu quả bảo vệ tối ưu. Các yêu cầu khi lắp đặt tủ ATSH bao gồm:

- Không đặt tủ ATSH gần cửa ra vào, cửa sổ; tránh vị trí hay có người đi lại; tránh luồng khí của quạt thông gió, điều hòa nhiệt độ... để hạn chế ảnh hưởng không tốt đến hướng luồng khí lưu thông trong tủ;

- Hai bên tủ ATSH cần cách tường hoặc thiết bị khác ít nhất là 30cm, cách trần nhà ít nhất là 40cm;

- Đặt tủ ATSH tại vị trí có sàn bằng phẳng;

Cần xây dựng quy trình sử dụng tủ ATSH và tuân thủ theo các bước trong quy trình này. Mỗi loại tủ ATSH khác nhau sẽ có quy trình sử dụng khác nhau. Tuy nhiên, việc sử dụng tủ ATSH cần theo các bước chung như sau:

- Mặc trang bị BHCN (áo choàng, găng tay, khẩu trang...);

- Đảm bảo tủ đã được nối với nguồn điện phù hợp;

- Bật công tắc nguồn của tủ (nếu cần);

- Tháo tấm che cửa hoặc đẩy cửa kính lên vị trí thích hợp;

- Bật đèn và quạt gió, chờ đến khi dòng khí ổn định (thường từ 3-5 phút hoặc đến khi hết tín hiệu cảnh báo);

- Nếu tủ ATSH không có đồng hồ hiển thị thì có thể kiểm tra hướng dòng khí lưu thông bằng cách đặt tờ giấy mềm hay dải lụa ở phía trước cửa tủ để xác định;

- Khử trùng bề mặt bên trong tủ bằng cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng thích hợp;

- Sắp xếp các vật dụng cần thiết cho quá trình làm việc vào trong tủ;

- Để tủ ATSH chạy ít nhất 3 phút cho không khí ổn định bên trong tủ;

- Tiến hành xét nghiệm;

- Sau khi kết thúc xét nghiệm, thay găng tay, lau bề mặt các dụng cụ bằng cồn 70% và đưa ra ngoài;

- Khử trùng bề mặt bên trong tủ bằng cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng thích hợp;

- Buộc túi đựng chất thải hoặc đóng nắp hộp đựng chất thải lây nhiễm, khử trùng bên ngoài túi/hộp đựng chất thải rồi đưa ra ngoài;

- Cởi bỏ găng tay;

- Để tủ ATSH chạy thêm 3 đến 5 phút nữa để loại bỏ không khí bị nhiễm bẩn ra khỏi khu vực làm việc;

- Đeo găng tay (nếu cần), tắt đèn và quạt gió;

- Đóng cửa tủ hoặc kéo cửa trượt về vị trí đóng kín;

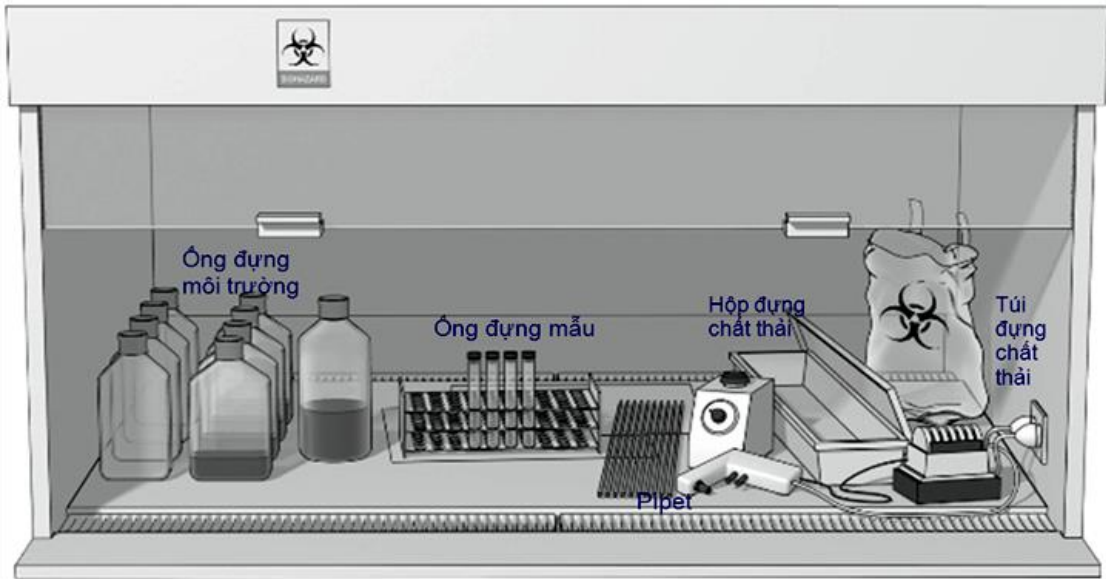
- Bật đèn tím khoảng 30 phút;

- Tắt tủ an toàn sinh học.

Một số lưu ý khi sử dụng tủ an toàn sinh học:

- Trước khi tiến hành công việc, cần chuẩn bị tất cả những thứ cần thiết như mẫu xét nghiệm, môi trường nuôi cấy, dụng cụ, thiết bị... để đưa vào trong tủ ATSH. Tránh đưa tay ra, vào tủ ATSH nhiều lần để lấy dụng cụ;

- Đưa tay ra, vào tủ một cách từ từ, không đưa tay nhanh vì có thể phá vỡ dòng không khí lưu thông tại cửa tủ ATSH;
- Chỉ đưa vào bên trong tủ những dụng cụ cần thiết cho công việc. Không để bất cứ vật gì lên trên lưới thông khí của tủ ATSH;
- Chia bề mặt làm việc của tủ ATSH thành 3 khu vực để sắp xếp dụng cụ, đồ vật: khu vực sạch, khu vực làm việc và khu vực bẩn. Ví dụ về cách sắp xếp dụng cụ vào bên trong tủ ATSH như hình 7. Có thể trải giấy thấm tại khu vực làm việc để thấm các giọt bắn hoặc khí dung tạo ra trong quá trình thao tác xét nghiệm;



**Hình 6.** Ví dụ về sắp xếp dụng cụ bên trong tủ an toàn sinh học

- Hạn chế sử dụng ngọn lửa hở (đèn ga, đèn cồn) bên trong tủ ATSH vì ngọn lửa hở có thể gây nhiễu loạn dòng khí lưu thông trong tủ ATSH và tăng nguy cơ cháy nổ trong tủ ATSH;
- Định kỳ vệ sinh đèn tím bên trong tủ ATSH để làm tăng hiệu quả khử trùng của đèn tím. Chỉ bật đèn tím khi đã kéo kín cửa kính phía trước xuống.

Hàng tuần, nhân viên PXN cần thực hiện khử trùng bề mặt làm việc và bề mặt bên trong tủ ATSH bằng cồn 70%, làm sạch tấm kính phía trước và đèn tím, kiểm tra lại nếu có bất kỳ dấu hiệu bất thường nào của tủ được ghi lại trong tuần.

Hàng tháng, cần lau bên ngoài, đặc biệt là phía trước và phía trên tủ bằng bằng khăn ẩm để làm sạch bụi; khử trùng bề mặt phía dưới bằng cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng phù hợp.

Hàng năm, PXN cần mời các cá nhân, đơn vị có năng lực và thẩm quyền đến kiểm tra và cấp giấy chứng nhận chất lượng của tủ ATSH.



### **6.3. Nồi hấp tiệt trùng**

Nồi hấp tiệt trùng tạo ra nhiệt độ cao và hơi nước bão hòa giúp tiêu diệt các tế bào VSV, kể cả các dạng bào tử (nha bào). Sử dụng nồi hấp tiệt trùng là biện pháp tiệt trùng các dụng cụ phòng xét nghiệm hiệu quả và đáng tin cậy nhất. Để tiệt trùng các vật liệu trong phòng xét nghiệm, có thể cài đặt nồi hấp theo những chu trình sau:

- Nhiệt độ 135°C, áp suất 2,2kg/cm<sup>2</sup> trong 7 phút: hấp tiệt trùng ống nghiệm, dụng cụ đã được đóng gói và vải;

- Nhiệt độ 135°C, áp suất 2,2kg/cm<sup>2</sup> trong 4 phút: dụng cụ không được đóng gói hoặc đậy nắp, đồ thủy tinh;

- Nhiệt độ 121°C, áp suất 1,1 kg/cm<sup>2</sup> trong 20 phút: vật liệu không chịu được nhiệt độ cao, nhựa và cao su;

- Nhiệt độ 121°C, áp suất 1,1 kg/cm<sup>2</sup> trong 20 phút, không sử dụng chu trình hút chân không: dung dịch đựng trong các chai, lọ không đậy nắp kín.

Tuy nhiên, với từng TNGB và điều kiện cụ thể có thể áp dụng các chu trình nhiệt khác nhau trong phòng xét nghiệm. Khi tiến hành tiệt trùng các vật liệu nhiễm TNGB ở bất kỳ chu trình nhiệt nào đều phải kiểm tra hiệu quả tiệt trùng bằng các loại chỉ thị hóa học hoặc chỉ thị sinh học.

Một số lưu ý khi sử dụng nồi hấp tiệt trùng:

- Khi xếp các vật liệu vào nồi hấp, không nên xếp quá sát nhau để đảm bảo hiệu quả tiệt trùng;

- Sử dụng túi đựng dụng cụ, chất thải làm bằng chất liệu chịu được nhiệt độ cao;

- Đối với các dụng cụ làm bằng chất liệu không chịu được nhiệt độ cao, khi cần khử nhiễm để tái sử dụng thì không tiệt trùng bằng nồi hấp;

- Chỉ mở nồi khi đồng hồ áp suất đã về 0Pa và nhiệt độ xuống thấp tới mức cho phép (dưới 80°C);

- Không nên buộc miệng túi quá chặt.

### **6.4. Máy trộn, máy nghiền, máy siêu âm, máy ly tâm**

Máy xay, trộn dùng trong gia đình thường hở và tạo ra hạt khí dung, do đó không dùng trong phòng xét nghiệm. Chỉ sử dụng những thiết bị được thiết kế chuyên dụng cho phòng xét nghiệm. Quá trình trộn, nghiền, ly tâm mẫu dung dịch chứa tác nhân gây bệnh có thể tạo ra khí dung. Do đó, nên tiến hành các công việc này trong tủ ATSH (nếu có thể). Một số lưu ý khi sử dụng máy ly tâm:

- Ống ly tâm nên làm bằng nhựa, có nắp đậy kín và nên dùng loại ống có nắp xoáy;

- Không cho dung dịch đầy quá 3/4 ống ly tâm;

- Trong quá trình ly tâm, các ống ly tâm phải được cân bằng và đặt đối xứng nhau;

- Kết thúc quá trình ly tâm, chờ máy dừng hẳn mới mở nắp buồng ly tâm;

- Trong trường hợp ly tâm ống dung dịch chứa TNGB ở tốc độ cao, không nên mở nắp ống ngay sau khi ly tâm. Nên đợi ít nhất 10 phút sau khi ly tâm để các hạt khí dung lắng xuống và không phát tán ra xung quanh;

- Nên mở nắp ống mẫu ly tâm trong tủ ATSH để tránh phát tán khí dung;

- Vệ sinh, kiểm tra, bảo dưỡng máy theo định kỳ.

## **7. Khử nhiễm, phân loại và thu gom chất thải**

### **7.1. Khử nhiễm trong phòng xét nghiệm**

Khử nhiễm là các quá trình loại bỏ, tiêu diệt vi sinh vật; loại bỏ hay trung hòa những hóa chất nguy hiểm và chất phóng xạ. Quá trình khử nhiễm gồm làm sạch, khử trùng và tiệt trùng được tiến hành tùy thuộc vào yêu cầu an toàn và điều kiện thực tế của từng phòng xét nghiệm.

#### **a. Làm sạch**

Làm sạch là quá trình loại bỏ bụi, hóa chất trong phòng xét nghiệm bằng cách sử dụng nước, chất tẩy rửa và một số hóa chất làm sạch. Thực hiện làm sạch trước sẽ giúp tăng hiệu quả của các biện pháp khử trùng hoặc tiệt trùng. Các biện pháp làm sạch được thực hiện tại phòng xét nghiệm như sau:

- Hút bụi, lau bề mặt sàn, tường phòng xét nghiệm bằng nước hoặc chất tẩy rửa;

- Lau bề mặt bàn làm việc, tủ ATSH;

- Lau bề mặt các máy móc, thiết bị thí nghiệm (như máy ly tâm, máy lắc, tủ lạnh...), bàn, ghế, các ngăn giá, tủ đựng dụng cụ, hóa chất;

- Rửa dụng cụ bằng nước, chất tẩy rửa bằng tay hoặc sử dụng máy rửa siêu âm;

- Rửa tay, giặt quần áo bảo hộ, khăn lau tay bằng nước và xà phòng.

#### **b. Khử trùng**

Khử trùng là quá trình tiêu diệt gần như toàn bộ các vi sinh vật gây bệnh trừ bào tử của vi khuẩn. Các biện pháp khử trùng áp dụng tại phòng xét nghiệm được chia thành ba loại biện pháp chính là: khử trùng bằng hóa chất và bằng tia cực tím.

##### **Khử trùng bằng hóa chất**

Có rất nhiều hóa chất được sử dụng để tiến hành khử trùng trong phòng xét nghiệm như cồn, hóa chất chứa clo, iốt, amoni bậc 4, phenol... Khi lựa chọn hóa chất để khử trùng, cần tìm hiểu về đặc tính kháng hóa chất khử trùng của vi sinh vật cần tiêu diệt, tính độc hại của hóa chất, ảnh hưởng của hóa chất tới vật liệu cần khử trùng... Một số hóa chất thường được sử dụng để khử trùng trong các phòng xét nghiệm như sau:

##### **Cồn**

Cồn có khả năng tiêu diệt vi khuẩn, virus, nấm nhưng không diệt được bào tử. Ngoài ra, cồn có tác dụng hạn chế đối với một số vi sinh vật kháng hóa chất khử nhiễm như vi khuẩn than, vi khuẩn lao...

Nồng độ còn được sử dụng để khử trùng là 60 - 90%, thường được sử dụng nhất là nồng độ 70%.

Ưu điểm của còn là giá thành thấp, không mùi, ít độc hại và không để lại lượng tồn dư. Tuy nhiên, nhược điểm của còn là không tiêu diệt được phổ rộng vi sinh vật và bào tử, dễ gây cháy, bay hơi nhanh nên hạn chế thời gian tiếp xúc với vi sinh vật.

Trong phòng xét nghiệm, còn được sử dụng để khử trùng tay, bề mặt bàn làm việc, tủ ATSH và dụng cụ xét nghiệm. Cần đựng còn trong các dụng cụ chứa phù hợp để tránh bay hơi, làm giảm tác dụng. Các chai đựng còn cần dán nhãn rõ ràng. Tuyệt đối không để còn gần lửa vì còn rất dễ cháy.

### **Hóa chất khử trùng chứa clo**

Các loại hóa chất khử trùng chứa clo khi hòa tan trong nước sẽ giải phóng ra một lượng clo hoạt tính có tác dụng tiêu diệt hiệu quả với phổ rộng các vi sinh vật, bao gồm cả vi khuẩn than, vi khuẩn lao... Tuy nhiên, loại hóa chất này không tiêu diệt được bào tử vi khuẩn, nấm.

Các hóa chất chứa clo thường được sử dụng trong phòng xét nghiệm bao gồm bột cloramin B, viên presept, nước Javen. Nồng độ clo hoạt tính khuyến cáo sử dụng để khử trùng trong phòng xét nghiệm là 0,5 – 1,25% clo hoạt tính. Các hóa chất khác nhau có hàm lượng clo hoạt tính khác nhau, do đó phải tính toán đủ lượng hóa chất cần thiết để đạt được dung dịch có nồng độ clo hoạt tính mong muốn. Công thức tính để pha hóa chất clo dạng dung dịch và dạng bột (hoặc viên) như sau:

- Pha từ hóa chất chứa clo dạng dung dịch (nước Javen)

$$\text{Số phần nước/phần dung dịch gốc} = \frac{\text{Nồng độ clo hoạt tính của hóa chất sử dụng}}{\text{Nồng độ clo hoạt tính của dung dịch cần pha}} - 1$$

- Pha từ hóa chất chứa clo dạng bột (Cloramin B) hoặc dạng viên (Presept)

$$\text{Lượng hóa chất (gam)} = \frac{\text{Nồng độ clo hoạt tính của dung dịch cần pha (\%)} \times \text{số lít}}{\text{Hàm lượng clo hoạt tính của hóa chất sử dụng (\%)}} \times 1000$$

Ưu điểm của hợp chất chứa clo là rẻ, có hiệu quả với phổ rộng vi sinh vật, tác động nhanh, không bị ảnh hưởng bởi nước cứng. Nhược điểm của loại hóa chất này là có thể gây kích ứng niêm mạc, tổn thương đường hô hấp, tiêu hóa, ăn mòn bề mặt kim loại khi sử dụng ở nồng độ cao, có thể tạo ra khí clo độc ở pH dưới 4, hóa chất đã pha loãng sẽ nhanh giảm tác dụng theo thời gian.

Hóa chất chứa clo được sử dụng trong phòng xét nghiệm để khử trùng bề mặt bàn làm việc, tủ ATSH, máy ly tâm, ngâm các dụng cụ xét nghiệm, xử lý nước thải... Khi sử dụng hóa chất chứa clo, cần lưu ý một số yếu tố sau:

- Sử dụng trang bị bảo hộ cá nhân phù hợp như khẩu trang, găng tay, kính, tạp dề... khi pha hóa chất;

- Chi pha hóa chất chứa clo với nước lạnh bởi vì nước nóng có thể làm phá hủy và làm giảm tác dụng của hóa chất;

- Không sử dụng nồng độ quá cao vì có thể gây độc và lãng phí hóa chất;
- Nếu bị hóa chất chứa clo bắn vào mắt, ngay lập tức phải rửa mắt bằng nước sạch ít nhất 15 phút và liên hệ với cơ sở y tế để được xử lý;
- Không nên pha lẫn hợp chất chứa clo với chất tẩy rửa vì có thể tạo ra khí độc. Trong quá trình khử nhiễm các bề mặt, cần làm sạch bằng cách sử dụng chất tẩy rửa, lau, rửa lại bằng nước rồi mới sử dụng dung dịch chứa clo để khử trùng;
- Hóa chất chứa clo phải bảo quản tránh ánh sáng;
- Các dung dịch khử trùng chứa clo sẽ giảm tác dụng nhanh theo thời gian, do đó chỉ pha đủ lượng cần sử dụng và phải sử dụng càng sớm càng tốt sau khi pha. Tốt nhất chỉ pha và sử dụng trong ngày (24 giờ), không pha sẵn để dự trữ.

#### *Khử trùng bằng tia cực tím (UV)*

Tia cực tím có tác dụng khử trùng là các tia có bước sóng từ 250 - 270nm (tối ưu là 254nm). Ở bước sóng này, tia cực tím có tác dụng tiêu diệt hầu hết các vi sinh vật trong không khí, nước và trên bề mặt. Hiệu quả khử trùng của đèn tím phụ thuộc vào nhiều yếu tố như cường độ ánh sáng tím, khoảng cách từ đèn tím đến vị trí cần khử trùng, loại vi sinh vật, nhiệt độ, độ ẩm của môi trường, các chất hữu cơ. Một số lưu ý khi sử dụng đèn cực tím để khử trùng trong phòng xét nghiệm:

- Định kỳ hàng tuần, cần làm sạch đèn UV để ngăn bụi, bẩn tích lũy làm ảnh hưởng đến hiệu quả khử trùng của đèn UV;
- Tia UV có thể gây bỏng mắt và da khi tiếp xúc trực tiếp trong một khoảng thời gian rất ngắn. Do đó, công tắc đèn UV nên lắp đặt ở bên ngoài phòng xét nghiệm và chỉ bật đèn UV khi không có người làm việc trong phòng xét nghiệm;
- Cường độ và hiệu quả diệt khuẩn của đèn UV giảm theo thời gian sử dụng, nên cần theo dõi và định kỳ kiểm tra cường độ tia UV.

Tiệt trùng là quá trình diệt hết mọi dạng sống của vi sinh vật, kể cả bào tử. Các biện pháp tiệt trùng áp dụng tại phòng xét nghiệm bao gồm tiệt trùng bằng nhiệt và tiệt trùng bằng hóa chất.

Tiệt trùng bằng nhiệt bằng cách sử dụng nồi hấp tiệt trùng hoặc tủ sấy khô. Để đạt hiệu quả tiệt trùng, tủ sấy khô cần duy trì nhiệt độ 160 - 180°C trong thời gian từ 2 đến 4 giờ, nồi hấp tiệt trùng cần duy trì nhiệt độ 120 – 135°C trong thời gian 20 - 30 phút.

Hóa chất được sử dụng để tiệt trùng trong phòng xét nghiệm là formaldehyde. Formaldehyde được sử dụng để xông hơi tủ ATSH hoặc phòng xét nghiệm. Vì formaldehyde là hóa chất độc, có thể gây ung thư, do đó, việc xông hơi formaldehyde yêu cầu phải được thực hiện bởi người đã được đào tạo, có kinh nghiệm và các dụng cụ, thiết bị cần thiết để thực hiện quá trình này.

## **7.2. Phân loại, thu gom chất thải**

Phòng xét nghiệm cần tiến hành phân loại, thu gom chất thải theo quy định tại Thông tư liên tịch số 58/2015/TTLT-BYT-BTNMT của Bộ Y tế và Bộ Tài nguyên và môi trường. Trong các phòng xét nghiệm cần trang bị đầy đủ các loại bao bì, dụng cụ

đựng chất thải y tế đặt tại các vị trí phù hợp. Ngoài ra, cần xây dựng hướng dẫn cách phân loại và thu gom chất thải và dán tại vị trí phân loại chất thải. Việc phân loại, thu gom chất thải tại phòng xét nghiệm cần đáp ứng yêu cầu sau:

- Tiến hành phân loại chất thải ngay tại nơi phát sinh và tại thời điểm phát sinh chất thải;

- Từng loại chất thải phải đựng trong các bao bì, dụng cụ, thiết bị lưu chứa chất thải có mã màu, biểu tượng, chất liệu theo đúng quy định:

- + Chất thải lây nhiễm sắc nhọn: Đựng trong thùng hoặc hộp có màu vàng;

- + Chất thải lây nhiễm không sắc nhọn: Đựng trong túi hoặc thùng có lót túi màu vàng;

- + Chất thải nguy hại không lây nhiễm dạng rắn: Đựng trong túi hoặc trong thùng có lót túi màu đen;

- + Chất thải nguy hại không lây nhiễm dạng lỏng: Đựng trong các dụng cụ có nắp đậy kín;

- + Chất thải y tế thông thường không phục vụ mục đích tái chế: Đựng trong túi hoặc trong thùng có lót túi màu xanh;

- + Chất thải y tế thông thường phục vụ mục đích tái chế: Đựng trong túi hoặc trong thùng có lót túi màu trắng.

- Các chất thải y tế nguy hại không có khả năng phản ứng, tương tác với nhau và áp dụng cùng một phương pháp xử lý có thể được phân loại chung vào cùng một bao bì, dụng cụ, thiết bị lưu chứa;

- Khi chất thải lây nhiễm đề lẫn với chất thải khác hoặc ngược lại thì hỗn hợp chất thải đó phải thu gom, lưu giữ và xử lý như chất thải lây nhiễm;

- Phải thu gom và lưu giữ riêng các loại chất thải lây nhiễm, chất thải nguy hại không lây nhiễm, chất thải y tế thông thường;

- Trong quá trình thu gom, túi đựng chất thải phải buộc kín, thùng đựng chất thải phải có nắp đậy kín, bảo đảm không bị rơi, rò rỉ chất thải trong quá trình thu gom;

- Cơ sở y tế quy định tuyến đường và thời điểm thu gom chất thải lây nhiễm phù hợp để hạn chế ảnh hưởng đến khu vực chăm sóc người bệnh và khu vực khác trong cơ sở y tế;

- Tần suất thu gom chất thải lây nhiễm từ nơi phát sinh về khu lưu giữ chất thải trong khuôn viên cơ sở y tế ít nhất 01 (một) lần/ngày.

## **8. Phòng ngừa, xử lý sự cố trong phòng xét nghiệm**

Có rất nhiều sự cố có thể xảy ra trong phòng xét nghiệm. Các sự cố thường xảy ra bao gồm: hỏa hoạn; tràn đổ dung dịch chứa TNGB, hóa chất; kim đâm vào tay; đồ vỡ trong máy ly tâm; bắn vật liệu lây nhiễm, hóa chất vào mắt... Để hạn chế Khả năng xảy ra và Hậu quả của các sự cố này, phòng xét nghiệm cần xây dựng kế hoạch phòng ngừa, xử lý sự cố gồm các nội dung sau:

- Tiến hành đánh giá nguy cơ xảy ra sự cố tại phòng xét nghiệm;
- Xác định, khoanh vùng các khu vực có nguy cơ xảy ra sự cố trong phòng xét nghiệm;
  - Xác định những người chịu trách nhiệm trong việc xử lý sự cố như người phụ trách ATSH, bác sĩ điều trị, nhân viên phòng xét nghiệm, bác sĩ thú y, cán bộ dịch tễ học và các đơn vị phòng cháy, chữa cháy, cảnh sát...
- Cung cấp, trang bị các trang thiết bị, dụng cụ cần thiết để phục vụ xử lý sự cố như:
  - + Hộp sơ cứu: trang bị đầy đủ các vật dụng cần thiết cho quá trình sơ cứu ban đầu như bông, băng, gạc, chất sát khuẩn...
  - + Bộ dụng cụ xử lý tràn đổ dung dịch chứa TNGB (spill kit) gồm các thành phần như: hộp đựng có kích thước phù hợp; trang bị BHCN (găng tay, bao giày, khẩu trang, kính...) với số lượng phù hợp; panh, kẹp; túi đựng chất thải lây nhiễm; hóa chất khử nhiễm phù hợp; khăn/giấy thấm; hướng dẫn các bước để xử lý sự cố;
  - + Thiết bị/dụng cụ rửa mắt...
- Liên hệ các cơ sở cách ly, điều trị cho người bị phơi nhiễm và lây nhiễm;
- Xây dựng các quy trình xử lý sự cố;
- Đào tạo, tập huấn cho nhân viên của cơ sở có phòng xét nghiệm về các biện pháp phòng ngừa và xử lý và khắc phục sự cố. Tổ chức diễn tập thường xuyên để nâng cao nhận thức và thực hành của nhân viên phòng xét nghiệm về việc phản ứng với các sự cố có thể xảy ra trong phòng xét nghiệm.

Dưới đây là hướng xử lý một số sự cố thường xảy ra trong phòng xét nghiệm.

### **Hướng dẫn xử lý sự cố tràn đổ dung dịch chứa TNGB**

- Báo cho đồng nghiệp làm việc gần đó (nếu có);
  - Tháo bỏ găng tay. Thay trang bị BHCN khác (áo choàng, quần, bao giày/ giầy...) nếu nghi ngờ có dung dịch chứa TNGB bắn vào;
  - Lấy bộ dụng cụ xử lý tràn đổ dung dịch chứa TNGB;
  - Phủ giấy thấm lên dung dịch bị đổ từ ngoài vào trong;
  - Đổ chất khử trùng lên vùng bị đổ theo chiều từ ngoài vào trong. Để khoảng 30 phút cho chất khử trùng phát huy tác dụng diệt khuẩn (thời gian tiếp xúc phụ thuộc vào loại hóa chất khử trùng và loại TNGB);
  - Thay găng tay mới. Gấp giấy thấm, dụng cụ đựng mẫu cho vào túi đựng chất thải lây nhiễm. Nếu có các mảnh vỡ sắc nhọn, dùng kẹp gấp mảnh vỡ bỏ vào hộp đựng vật sắc nhọn;
  - Lau sạch vùng bị đổ bằng khăn/giấy thấm và cho khăn/giấy thấm vào túi đựng chất thải lây nhiễm;
  - Thay găng tay, rửa tay;
  - Ghi chép, báo cáo sự việc với cán bộ phụ trách phòng xét nghiệm;

- Trong trường hợp đổ tràn dung dịch chứa TNGB bên trong tủ ATSH, cần lưu ý:

+ Phải để tủ tiếp tục chạy để ngăn chặn sự phát sinh khí dung ra bên ngoài tủ trong quá trình xử lý sự cố;

+ Khi sử dụng hóa chất chứa clo để xử lý sự cố thì cần phải lau lại bằng nước để tránh hóa chất chứa clo ăn mòn bề mặt kim loại của tủ.

Trường hợp đổ tràn dung dịch chứa TNGB lây qua đường hô hấp cần ngay lập tức ra khỏi phòng xét nghiệm, cảnh báo những người xung quanh không được vào phòng và đợi ít nhất 30 phút để khí dung tạo ra trong quá trình đổ tràn lắng xuống hoặc trao đổi ra ngoài thì mới tiến hành xử lý các bước tiếp theo.

### **Hướng dẫn xử lý sự cố vỡ ống chứa vật liệu lây nhiễm bên trong máy ly tâm**

- Khi phát hiện đổ vỡ ống chứa vật liệu lây nhiễm trong máy ly tâm, ngay lập tức đóng nắp máy ly tâm lại, đợi 30 phút cho khí dung tạo ra trong máy ly tâm lắng xuống. Trường hợp phát hiện đổ vỡ khi đang ly tâm, lập tức tắt máy và đợi 30 phút.

- Lấy bộ dụng cụ xử lý đánh đổ dung dịch chứa TNGB;

- Đeo thêm lớp găng tay dày;

- Dùng kẹp gấp những mảnh vỡ ống ly tâm bỏ vào hộp đựng chất thải sắc nhọn;

- Tháo và ngâm toàn bộ rotor trong dung dịch chất khử nhiễm không ăn mòn vật liệu của rotor trong thời gian thích hợp (khoảng 30 phút);

- Rửa rotor lại với nước và để khô;

- Lau khoang bên trong máy ly tâm bằng khăn/giấy thấm thấm chất khử nhiễm không ăn mòn vật liệu chế tạo máy ly tâm;

- Tháo găng tay, rửa tay;

- Ghi chép, báo cáo sự việc với cán bộ phụ trách phòng xét nghiệm;

Trường hợp máy ly tâm có cốc ly tâm an toàn, khi xảy ra đổ vỡ, đem toàn bộ cốc ly tâm an toàn chứa ống bị vỡ vào trong tủ ATSH để tiến hành xử lý.

### **Hướng dẫn xử lý sự cố bị vật sắc nhọn đâm vào tay khi làm việc với tác nhân gây bệnh**

- Báo với đồng nghiệp làm việc gần đó (nếu có);

- Bộc lộ vết thương (ví dụ cởi hoặc xé găng tay);

- Xối ngay vết thương dưới vòi nước sạch (khoảng 5 phút). Lưu ý, để vết thương tự chảy máu, không nặn bóp hay chà xát vết thương;

- Rửa khu vực vết thương bằng xà phòng và nước sạch;

- Sử dụng băng gạc với chất khử trùng thích hợp để che vết thương;

- Ghi chép và báo cáo sự việc với người phụ trách phòng xét nghiệm;

- Tùy từng trường hợp cụ thể có các biện pháp xử lý tiếp theo phù hợp.

**PHỤ LỤC**  
**BẢNG ĐÁNH GIÁ NGUY CƠ TRONG PHÒNG XÉT NGHIỆM**

**Bảng 1.** Danh sách các quy trình

<b>STT</b>	<b>Tên quy trình</b>	<b>Mã số quy trình</b>	<b>Các bước trong quy trình</b>
1.			
2.			



**Bảng 2. Đánh giá nguy cơ quy trình**

1. Xác định nguy hiểm/nguy cơ				2. Xác định mức độ nguy cơ				3. Kiểm soát nguy cơ	
1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	3a	3b
TT bước	Tên bước thực hiện	Nguy hiểm	Nguy cơ có thể xảy ra	Biện pháp kiểm soát hiện tại (nếu có)	Khả năng xảy ra	Hậu quả	Mức độ nguy cơ	Biện pháp kiểm soát bổ sung	Người chịu trách nhiệm, thời gian hoàn thành
Tên quy trình:						Mã số quy trình:			

**Thư ký**

**Trưởng nhóm đánh giá**

# ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM VI SINH LÂM SÀNG

## 1. Mục đích

Chương trình đảm bảo chất lượng là phương tiện có hiệu quả để đảm bảo thực hiện các tiêu chuẩn của phòng xét nghiệm chẩn đoán nói chung và phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng nói riêng. Chất lượng của một thử nghiệm bao gồm độ tin cậy và độ tái lập. Tuy nhiên, chất lượng của một thử nghiệm vi sinh lâm sàng phải được xem xét thêm cả về tốc độ, giá thành và sự ích lợi /sự phù hợp về mặt lâm sàng của thử nghiệm.

## 2. Phạm vi áp dụng

Phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

## 3. Trách nhiệm

- Phụ trách kỹ thuật có trách nhiệm xây dựng kế hoạch, triển khai thực hiện chương trình Đảm bảo Chất lượng của phòng xét nghiệm.

- Nhân viên Quản lý chất lượng và/hoặc Kỹ thuật viên trưởng khoa có trách nhiệm giám sát việc thực hiện.

- Nhân viên phòng xét nghiệm có trách nhiệm thực hiện theo sự phân công của lãnh đạo phòng xét nghiệm.

## 4. Các yếu tố ảnh hưởng đến độ tin cậy và độ tái lập của một thử nghiệm

### a. Nhân lực

Chất lượng đào tạo và huấn luyện của nhân viên phòng xét nghiệm, kinh nghiệm cá nhân và điều kiện làm việc có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng làm việc của họ.

### b. Yếu tố môi trường ngoại cảnh

Không gian làm việc không phù hợp, ánh sáng hoặc thông khí, nhiệt độ, tiếng ồn, điều kiện làm việc không an toàn có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.

### c. Bệnh phẩm

- Phương pháp, thời gian lấy mẫu và loại bệnh phẩm: ngoài tầm kiểm soát trực tiếp của phòng xét nghiệm nhưng ảnh hưởng đến độ tin cậy của thử nghiệm.

- Vận chuyển, bảo quản, chuẩn bị bệnh phẩm: có ảnh hưởng đến chất lượng của thử nghiệm. Phòng xét nghiệm có thể kiểm soát tốt các yếu tố trên bằng các bảng hướng dẫn về việc lấy bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản bệnh phẩm cho nhân viên y tế, định kỳ xem xét cùng với các bác sĩ và điều dưỡng khoa lâm sàng.

### d. Vật dụng phòng xét nghiệm

Chất lượng của trang thiết bị, hóa chất, sinh phẩm sử dụng trong phòng xét nghiệm đều ảnh hưởng đến độ tin cậy của kết quả thử nghiệm.

### **e. Phương pháp thử nghiệm**

Cần chọn phương pháp thử nghiệm đáng tin cậy nhất trong số nhiều phương pháp khác nhau.

### **f. Trang thiết bị của phòng xét nghiệm**

Thiếu hoặc sử dụng trang thiết bị (không đúng tiêu chuẩn hoặc bảo trì bảo dưỡng kém) sẽ cho kết quả thử nghiệm không đáng tin cậy.

### **g. Khảo sát và đọc kết quả**

Đọc nhanh hoặc không khảo sát kỹ số quang trường trên kính hiển vi có thể gây sai sót cho kết quả xét nghiệm.

### **h. Báo cáo kết quả**

Mô tả sai hoặc báo cáo không đầy đủ sẽ ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.

## **5. Chất lượng của việc đánh giá kết quả xét nghiệm**

Đánh giá kết quả xét nghiệm là một phần quan trọng trong phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Trong từng giai đoạn của quá trình khảo sát bệnh phẩm, kết quả xét nghiệm phải được đánh giá nhằm chọn ra thử nghiệm tối ưu (về mặt thời gian thực hiện thử nghiệm và độ tin cậy của thử nghiệm) cho giai đoạn tiếp theo của quá trình khảo sát.

## **6. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm vi sinh lâm sàng**

**a. Đảm bảo chất lượng vi sinh lâm sàng:** bao gồm tất cả các hoạt động của phòng xét nghiệm nhằm có được kết quả xét nghiệm vi sinh có chất lượng tốt, bao gồm các yếu tố như:

- Sự thông hiểu (comprehensive): Hiểu rõ các bước trong một chu trình khảo sát bắt đầu từ khi lấy bệnh phẩm cho đến khi bác sĩ lâm sàng nhận được kết quả xét nghiệm.

- Phụ lục 1. Các bước thực hiện của phòng xét nghiệm vi sinh của chu trình khảo sát bệnh nhân nhiễm khuẩn.

- Sự hợp lý (rational): Chú ý các giai đoạn quan trọng nhất trong một chu trình khảo sát.

- Sự đều đặn (regular): Giám sát liên tục các giai đoạn thực hiện thử nghiệm.

- Sự thường xuyên (frequent): Xác định và điều chỉnh sai sót nếu có.

**b. Đảm bảo chất lượng:** sẽ giúp các thử nghiệm đất liền được sử dụng một cách tiết kiệm nhất, xác nhận giá trị chẩn đoán của các thử nghiệm mới, cải thiện hiệu quả làm việc trong phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng cũng như có thể đưa ra các kết quả xét nghiệm đáng tin cậy.

### **c. Hình thức đảm bảo chất lượng**

Có hai hình thức trong đảm bảo chất lượng, đó là:

✓ **Nội kiểm tra chất lượng:** hay còn gọi là **KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG.**

- Mỗi phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng nên xây dựng kế hoạch kiểm soát chất lượng của từng thử nghiệm, bao gồm việc giám sát liên tục chất lượng của thử nghiệm và kiểm tra có hiệu quả tất cả các bước thực hiện trong một chu trình khảo sát.

- Phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng phải có trách nhiệm đối với bệnh nhân trong việc đưa ra các kết quả xét nghiệm chính xác và có ý nghĩa. Do đó, nội kiểm tra chất lượng là yếu tố rất quan trọng cho một quy trình thao tác chuẩn tốt.

✓ **Ngoại kiểm tra chất lượng: hay còn gọi là ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG.**

Các hoạt động của phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng được kiểm soát bởi một cơ quan thứ ba (cơ quan bên ngoài). Ở một vài quốc gia thì cơ quan quản lý nhà nước về y tế sẽ qui định việc các phòng xét nghiệm tham gia Ngoại kiểm tra chất lượng là bắt buộc và phải được cấp giấy chứng nhận cho phòng xét nghiệm đó. Ngoại kiểm tra chất lượng bao gồm việc giám sát định kỳ chất lượng của thử nghiệm, kiểm tra tại chỗ các thử nghiệm định danh vi khuẩn, đôi khi là các kỹ thuật phân lập vi khuẩn.

## **7. Tiêu chuẩn chất lượng phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng**

### **a. Ý nghĩa lâm sàng**

Một tiêu chí quan trọng về chất lượng đối với một thử nghiệm vi sinh là thử nghiệm này giúp ích bao nhiêu phần trăm cho việc phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm trùng, đó chính là tiêu chí “ý nghĩa lâm sàng”. Tiêu chí này chỉ có thể được đảm bảo khi có sự trao đổi thông tin tốt giữa bác sĩ lâm sàng và phòng xét nghiệm.

Tóm lại, một thử nghiệm có chất lượng tốt là thử nghiệm chính xác và cho kết quả giúp ích cho việc phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm trùng; không nhất thiết phải phân lập và định danh tất cả các loại vi khuẩn trong cùng một bệnh phẩm.

### **b. Độ tin cậy**

✓ Thử nghiệm định lượng:

Độ tin cậy được đo bằng sự tương đồng giữa kết quả xét nghiệm với giá trị thật của thử nghiệm. Ví dụ như thử nghiệm định lượng kháng sinh trong huyết thanh, đo giá trị MIC của kháng sinh *in vitro*, chuẩn độ kháng thể trong huyết thanh.

✓ Thử nghiệm định tính:

Độ tin cậy được đo bằng xác suất đúng của kết quả xét nghiệm. Ví dụ như thử nghiệm định danh vi khuẩn, thử nghiệm kháng sinh đồ bằng phương pháp khuếch tán trên thạch.

Sử dụng thuật ngữ tiêu chuẩn khi định danh vi khuẩn là điều cần thiết cho độ tin cậy của thử nghiệm. Do đó, phòng xét nghiệm nên sử dụng các danh pháp quốc tế đã được công nhận. Ví dụ như vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (không nên sử dụng “Cầu khuẩn gây bệnh”) hoặc vi khuẩn *Streptococcus pyogenes* (không nên sử dụng “Liên cầu khuẩn tan máu (tiêu huyết”).

Ngoài ra, phòng xét nghiệm nên sử dụng các phương pháp thống nhất đã được phê duyệt. Ví dụ như thử nghiệm kháng sinh đồ thì phòng xét nghiệm nên sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa giấy trên thạch (Kirby-Bauer cải biên).

### **c. Độ lặp lại**

- Hai yếu tố làm giảm độ lặp lại của một thử nghiệm vi sinh:

+ Thiếu tính đồng nhất: một bệnh phẩm từ một bệnh nhân có thể có hơn một loại vi khuẩn. Do đó, khi lặp lại thử nghiệm thì phòng xét nghiệm có thể phân lập được các loại vi khuẩn khác nhau.

+ Thiếu tính ổn định: các vi khuẩn trong bệnh phẩm theo thời gian sẽ tăng sinh hoặc chết đi theo tỷ lệ khác nhau. Do đó, khi lặp lại thử nghiệm thì phòng xét nghiệm có thể phân lập được các vi khuẩn khác nhau.

- Do đó, để cải thiện độ lặp lại của thử nghiệm, bệnh phẩm phải được thực hiện xét nghiệm càng sớm càng tốt ngay sau khi lấy bệnh phẩm.

### **d. Hiệu quả (efficiency)**

Hiệu quả của một thử nghiệm vi sinh là khả năng cho chẩn đoán đúng tác nhân gây bệnh hoặc tình trạng bệnh lý. Có hai tiêu chuẩn để đánh giá hiệu quả:

- Độ nhạy (sensitivity):

+ Độ nhạy = Tổng số thử nghiệm dương tính / Tổng số bệnh nhân bị nhiễm khuẩn

+ Độ nhạy càng cao thì tỷ lệ âm tính giả của thử nghiệm càng thấp.

- Độ đặc hiệu (specificity):

+ Độ đặc hiệu = Tổng số thử nghiệm âm tính / Tổng số bệnh nhân không bị nhiễm khuẩn.

+ Độ đặc hiệu càng cao thì tỷ lệ dương tính giả của thử nghiệm càng thấp.

- Sự liên quan giữa độ nhạy cảm và độ đặc hiệu của thử nghiệm:

Độ nhạy cảm và độ đặc hiệu của thử nghiệm có liên quan với nhau. Lý tưởng là một thử nghiệm có độ nhạy cảm và độ đặc hiệu cùng cao. Tuy nhiên, trên thực tế, độ nhạy cảm và độ đặc hiệu có mối liên quan nghịch chiều, đó chính là hiện tượng “nghịch đổi” (trade-off) giữa độ nhạy cảm và độ đặc hiệu. Hiện tượng này có liên quan đến vị trí điểm cắt (Cut-off value), đó là điểm phân chia giữa bình thường và bệnh lý.

## **8. Nội kiểm tra chất lượng**

### **a. Các yêu cầu**

Chương trình nội kiểm tra chất lượng của phòng xét nghiệm nên được xây dựng phù hợp với thực tế của phòng xét nghiệm, dễ thực hiện và tiết kiệm.

Phòng xét nghiệm nên có kế hoạch thực hiện nội kiểm tra chất lượng nhằm đánh giá từng quy trình, sinh phẩm, các hộp thạch nuôi cấy tùy theo sơ đồ thực tế và mức độ quan trọng của từng vấn đề của một chu trình mà phòng xét nghiệm muốn giám sát.

## **b. Các bước thực hiện**

✓ Sổ tay thực hành phòng xét nghiệm:

Hoạt động của phòng xét nghiệm phải giám sát sự tuân thủ các “quy trình thao tác chuẩn” trong Sổ tay thực hành phòng xét nghiệm. Sổ tay này phải được xem xét và cập nhật định kỳ. Nội dung có thể bao gồm: vệ sinh nơi làm việc; vệ sinh cá nhân; an toàn lao động; phân định rõ ràng khu vực làm việc và khu vực sinh hoạt; xử lý và loại bỏ dụng cụ bị nhiễm bẩn; tiêm phòng thích hợp, ví dụ như virus viêm gan B, lao, thương hàn; bảo quản trang thiết bị; hướng dẫn lấy bệnh phẩm; tiếp nhận bệnh phẩm ban đầu; xử lý bệnh phẩm ban đầu; thải loại bệnh phẩm sau khi thực hiện thử nghiệm; ghi nhận kết quả xét nghiệm và báo cáo kết quả xét nghiệm.

✓ Trang thiết bị:

Bảo dưỡng tốt trang thiết bị phòng xét nghiệm rất quan trọng. Không thể có một thử nghiệm có chất lượng tốt nếu sử dụng thiết bị kém chất lượng hoặc thiết bị được bảo dưỡng kém.

Phụ lục 2. Kiểm soát chất lượng các thiết bị chủ yếu của phòng xét nghiệm vi sinh.

Phụ lục 3. Bảng ghi nhận nhiệt độ của thiết bị.

✓ **Môi trường nuôi cấy:**

Môi trường nuôi cấy có thể được pha chế từ nguyên liệu thô hoặc từ sinh phẩm thương mại dưới dạng bột khô. Phòng xét nghiệm nên sử dụng môi trường nuôi cấy pha chế từ sinh phẩm thương mại dưới dạng bột khô vì có chất lượng tốt hơn, tiết kiệm chi phí vận chuyển và bảo quản. Để có kết quả tốt nhất thì phòng xét nghiệm cần lưu ý đến:

- Chọn lựa môi trường nuôi cấy: Phòng xét nghiệm nên dự trữ một số lượng tối thiểu loại môi trường nuôi cấy cần thiết cho tất cả các thử nghiệm vi sinh được thực hiện tại phòng xét nghiệm. Ví dụ như môi trường dinh dưỡng cơ bản có thể được sử dụng để điều chế các hộp thạch máu (blood agar), các hộp thạch nâu (chocolate agar) và một vài môi trường có tính chất chọn lọc (selective media); hoặc để phân lập các vi khuẩn đường ruột gây bệnh từ phân thì phòng xét nghiệm cần phải có một loại môi trường có tính chọn lọc cao (như *Salmonella-Shigella* agar hoặc deoxycholate citrate agar) và một loại môi trường có tính chọn lọc thấp hơn (như Mac Conkey agar). Ngoài ra, phòng xét nghiệm cần phải có một số loại môi trường có tính chất chuyên biệt hơn như Muller Hinton agar (để thực hiện kháng sinh đồ) hoặc môi trường phân lập vi khuẩn *Campylobacter* spp.

- Đặt hàng và bảo quản môi trường nuôi cấy dạng bột khô:

+ Đặt hàng đủ dùng cho 6 - 12 tháng;

- + Một đơn vị đóng gói đủ dùng trong 1 - 2 tháng;
- + Khi nhận hàng thì kiểm tra nắp có vặn chặt hay không để tránh bị hấp phụ hơi nước làm giảm chất lượng của hàng hóa;
- + Ghi ngày nhận trên từng hộp môi trường nuôi cấy;
- + Lưu giữ nơi có thông khí tốt, mát và tránh ánh nắng mặt trời;
- + Bảo đảm sử dụng trước các hộp môi trường nuôi cấy có hạn sử dụng ngắn hơn;
- + Khi mở hộp môi trường nuôi cấy, phải ghi ngày mở trên hộp;
- + Loại bỏ các hộp môi trường nuôi cấy bị hư hỏng (vón cục, sẫm màu);
- + Có sổ theo dõi số lượng hàng hóa đang lưu giữ.
- + Điều chế môi trường nuôi cấy:
  - + Tuân thủ đúng theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất khi điều chế môi trường nuôi cấy.
  - + Chuẩn bị đủ số lượng để sử dụng trước khi hết hạn sử dụng của hộp môi trường khô.
    - Lưu giữ môi trường nuôi cấy:
      - + Tránh nơi có ánh sáng mặt trời trực tiếp.
      - + Tránh nơi quá nóng. Các môi trường nuôi cấy có bổ sung máu, các chất hữu cơ hoặc kháng sinh thì nên lưu giữ trong tủ lạnh.
    - + Thời gian sử dụng sau khi pha chế thay đổi tùy theo loại dụng cụ chứa:
      - Ống nghiệm có nút gòn không thấm nước : 3 tuần.
      - Ống nghiệm có nắp không chặt : 2 tuần.
      - Dụng cụ có nắp vặn chặt : 3 tháng.
      - Các hộp Petri (chứa trong túi nylon đóng kín): 4 tuần.
    - Kiểm soát chất lượng môi trường nuôi cấy:
      - + Kiểm tra pH:
        - Đối với các môi trường nuôi cấy được pha chế theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất từ dạng bột khô thì không cần thiết kiểm tra pH hàng ngày, tuy nhiên cần có kế hoạch kiểm tra định kỳ ít nhất 1 lần/tháng.
          - Khi kiểm tra pH cần phải đợi cho môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 50 - 60°C.
          - Sai số cho phép là 0,2 đơn vị. Nếu không đạt thì phải điều chỉnh pH cho phù hợp bằng dung dịch acid hoặc kiềm; hoặc pha chế lại lô môi trường nuôi cấy mới.
      - + Kiểm tra vô trùng:

- Phải thực hiện thường qui kiểm tra vô trùng khi điều chế môi trường nuôi cấy có cho thêm máu hoặc các chất khác sau khi hấp tiệt trùng. Tuy nhiên, yêu cầu của một số hệ thống quản lý chất lượng phòng xét nghiệm (như ISO 15189:2012) là tất cả các môi trường nuôi cấy được pha chế tại phòng xét nghiệm.

- Thông thường, có thể kiểm tra 3 - 5% số lượng môi trường nuôi cấy pha chế, ủ ấm 35°C trong 48 giờ. Số hộp môi trường nuôi cấy còn lại sẽ lưu giữ trong tủ lạnh 2 - 8°C. Nếu có trên 2 CFU/hộp petri thì phải loại bỏ lô môi trường nuôi cấy pha chế đó.

+ Kiểm tra chất lượng môi trường:

- Phòng xét nghiệm nên lưu giữ một số vi khuẩn để kiểm tra hiệu năng của môi trường nuôi cấy. Các vi khuẩn này có thể được lưu giữ từ bệnh phẩm lâm sàng hoặc từ phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc từ sản phẩm thương mại.

Phụ lục 4. Danh sách các vi khuẩn lưu giữ dùng để kiểm soát chất lượng.

Phụ lục 5. Danh mục thử nghiệm thường sử dụng để kiểm chất lượng một số môi trường nuôi cấy.

+ Các bước thực hiện thử nghiệm kiểm tra hiệu năng đối với lô môi trường nuôi cấy mới:

- Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương đương Mc Farland 0.5;
- Sử dụng 1 ống/khuyên cấy đầy huyền dịch vi khuẩn cấy lên môi trường nuôi cấy;
- Ủ ấm trong điều kiện riêng (tùy thuộc vào loại vi khuẩn thử nghiệm) và đọc kết quả theo quy trình thường qui;

- Lưu giữ riêng hồ sơ các kết quả kiểm tra.

- Sinh phẩm (thuốc nhuộm và thuốc thử):

Phụ lục 6. Yêu cầu về kiểm tra chất lượng một số sinh phẩm thường sử dụng.

+ Các thử nghiệm nên được thực hiện đối với mỗi lô sinh phẩm mới, mỗi lô sản xuất, mỗi lần nhận hàng và định kỳ;

+ Các sinh phẩm cần được thải bỏ khi:

- Hết hạn sử dụng;

- Nhận thấy các dấu hiệu mất hoạt tính như bị đục, bị kết tủa hoặc bị mất màu.

- Thử nghiệm độ nhạy cảm kháng sinh (Nội dung này được viết theo tài liệu Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. J. Vandepitte and J. Verhaegen et al. 2nd edition, 2003, WHO. Ngoài ra, có thể tham khảo thêm bài “Kiểm soát chất lượng kháng sinh đồ” của TS. Phạm Hồng Nhung cập nhật theo tài liệu CLSI 2015).

Phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng nên sử dụng phương pháp Kirby-Bauer để thử nghiệm độ nhạy cảm kháng sinh (kháng sinh đồ). Để kiểm soát chất lượng của thử nghiệm, phòng xét nghiệm nên chú ý các điểm sau đây:



- + Đường kính đĩa giấy kháng sinh, thường là 6 - 6,35mm;
- + Nồng độ kháng sinh của đĩa giấy;
- + Lưu giữ đĩa giấy kháng sinh dự trữ ở tủ đông -20°C;
- + Các đĩa giấy kháng sinh sử dụng hàng ngày nên được lưu giữ ở tủ lạnh (2 - 8°C) nhưng không được quá 1 tháng;
- + Nên sử dụng môi trường Muller-Hinton (có hoặc không cho thêm máu và chất bổ sung) để thực hiện thử nghiệm;
- + Điều chỉnh đúng pH (7,2 - 7,4) của môi trường làm kháng sinh đồ là cần thiết cho hầu hết các kháng sinh;
- + Huyền dịch vi khuẩn phải đạt độ đục mong muốn (thông thường độ đục tương đương Mc Farland 0,5);
- + Đo đường kính vùng ức chế chính xác;
- + Đánh giá đường kính vùng ức chế theo bảng tiêu chuẩn quốc tế đối với từng loại kháng sinh và từng loại vi khuẩn, có thể là tiêu chuẩn CLSI (Mỹ) hoặc tiêu chuẩn châu Âu (EUCAST).
- + Kiểm soát chất lượng đĩa giấy kháng sinh bằng các chủng vi khuẩn tham chiếu, ít nhất là ba chủng vi khuẩn sau đây: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Escherichia coli* (ATCC 25922) và *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853);
- + Thực hiện kiểm soát chất lượng với ba chủng vi khuẩn trên khi:
  - Đưa vào sử dụng kháng sinh mới;
  - Đưa vào sử dụng lô môi trường mới làm kháng sinh đồ;
  - Mỗi tuần 1 lần hoặc cùng ngày thực hiện kháng sinh đồ, tùy theo qui mô từng phòng xét nghiệm.

Phụ lục 7. Phiếu ghi nhận và theo dõi kết quả kiểm soát chất lượng đĩa giấy kháng sinh.

✓ **Bảo quản và sử dụng các chủng vi khuẩn được lưu giữ:**

- Chọn lựa và nguồn gốc chủng vi khuẩn
- Nguồn cung cấp các chủng vi khuẩn này:
  - + Phân lập và đã được định danh từ bệnh phẩm lâm sàng;
  - + Sản phẩm thương mại;
  - + Ngoại kiểm tra chất lượng;
  - + Phòng xét nghiệm tham chiếu.
- Lưu giữ:

+ Dài hạn: Cho phép lưu giữ khoảng vài tháng đến nhiều năm. Phương pháp tốt nhất là lưu giữ dạng đông khô, nhiệt độ  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ , có thể sử dụng tủ đông sâu hoặc bình Nitơ lỏng.

+ Ngắn hạn: áp dụng cho các chủng vi khuẩn được sử dụng hàng ngày. Môi trường dinh dưỡng, có thể cho thêm máu (thạch máu hoặc thạch nâu), trong ống thạch nghiêng được cấy vi khuẩn, ủ  $35^{\circ}\text{C}$  qua đêm, lưu giữ ở nhiệt độ  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  và cấy chuyển mỗi 2 tuần (vi khuẩn Streptococci và vi khuẩn thông thường) hoặc ở nhiệt độ phòng xét nghiệm và cấy chuyển mỗi 2 lần/tuần (vi khuẩn Meningococci và *Haemophilus*) hoặc cấy chuyển mỗi 2 ngày (vi khuẩn Gonococci).

#### ✓ Sử dụng phòng xét nghiệm tham chiếu:

- Phòng xét nghiệm nên sử dụng phòng xét nghiệm tham chiếu để gửi mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau đây:

+ Các thử nghiệm chuyên biệt hoặc không thường gặp tại phòng xét nghiệm (như phân lập virus, huyết thanh chẩn đoán bệnh nhiễm ký sinh trùng);

+ Phòng xét nghiệm cần kiểm tra ngẫu nhiên kết quả của mình;

+ Bệnh phẩm cần được xác nhận thêm về tính đặc hiệu, xác định serogroup hoặc serotype của vi khuẩn hoặc tác nhân vi khuẩn quan trọng đối với sức khỏe của cộng đồng (như *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Brucella*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*).

Phòng xét nghiệm tham chiếu có thể cung cấp các chủng vi khuẩn tham khảo để thực hiện kiểm soát chất lượng (nội kiểm tra chất lượng) và đào tạo nhân viên, và cung cấp các huyết thanh và sinh phẩm để phòng xét nghiệm có thể thực hiện thử nghiệm để tự đánh giá chất lượng khi so sánh với kết quả của phòng xét nghiệm tham chiếu (ngoại kiểm tra chất lượng).

- Phòng xét nghiệm tham chiếu cũng có thể là nơi cung cấp dịch vụ ngoại kiểm tra chất lượng cho các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

## 9. Ngoại kiểm tra chất lượng

### a. Mục đích

- Đảm bảo chất lượng của kết quả chẩn đoán của phòng xét nghiệm;
- Đánh giá và so sánh độ tin cậy hoạt động của phòng xét nghiệm với các phòng xét nghiệm khác trên cả nước;
- Xác định các lỗi thường gặp;
- Khuyến khích sử dụng thống nhất các quy trình;
- Khuyến khích sử dụng các sinh phẩm chuẩn thức;
- Có biện pháp hành chính (có thể thu hồi giấy phép hoạt động của phòng xét nghiệm đối với các phòng xét nghiệm chưa đạt chuẩn);
- Thúc đẩy các phòng xét nghiệm thực hiện các chương trình nội kiểm tra.

### **b. Tổ chức thực hiện**

- Chương trình này bao gồm một hoặc nhiều đợt khảo sát trong đó các mẫu khảo sát được gửi bằng đường bưu điện đến phòng xét nghiệm tham gia. Các mẫu khảo sát này phải được phòng xét nghiệm triển khai thực hiện như là một mẫu bệnh phẩm hàng ngày của phòng xét nghiệm.

- Các yêu cầu đối với các mẫu ngoại kiểm bao gồm các điều kiện sau (Tuy nhiên còn tùy thuộc vào chương trình ngoại kiểm mà phòng xét nghiệm tham gia):

- + Mẫu khảo sát phải được thực hiện ít nhất 4 lần / năm;
- + Mỗi đợt khảo sát phải có ít nhất 3 mẫu phẩm;
- + Thời gian báo cáo kết quả phải ngắn (ví dụ như 2 tuần kể từ khi nhận được mẫu phẩm);
- + Mỗi đợt khảo sát phải kèm theo các hướng dẫn và mẫu báo cáo;
- + Báo cáo nên được lưu thành 02 bản và có ghi thời hạn cuối cùng để báo cáo của đợt khảo sát.

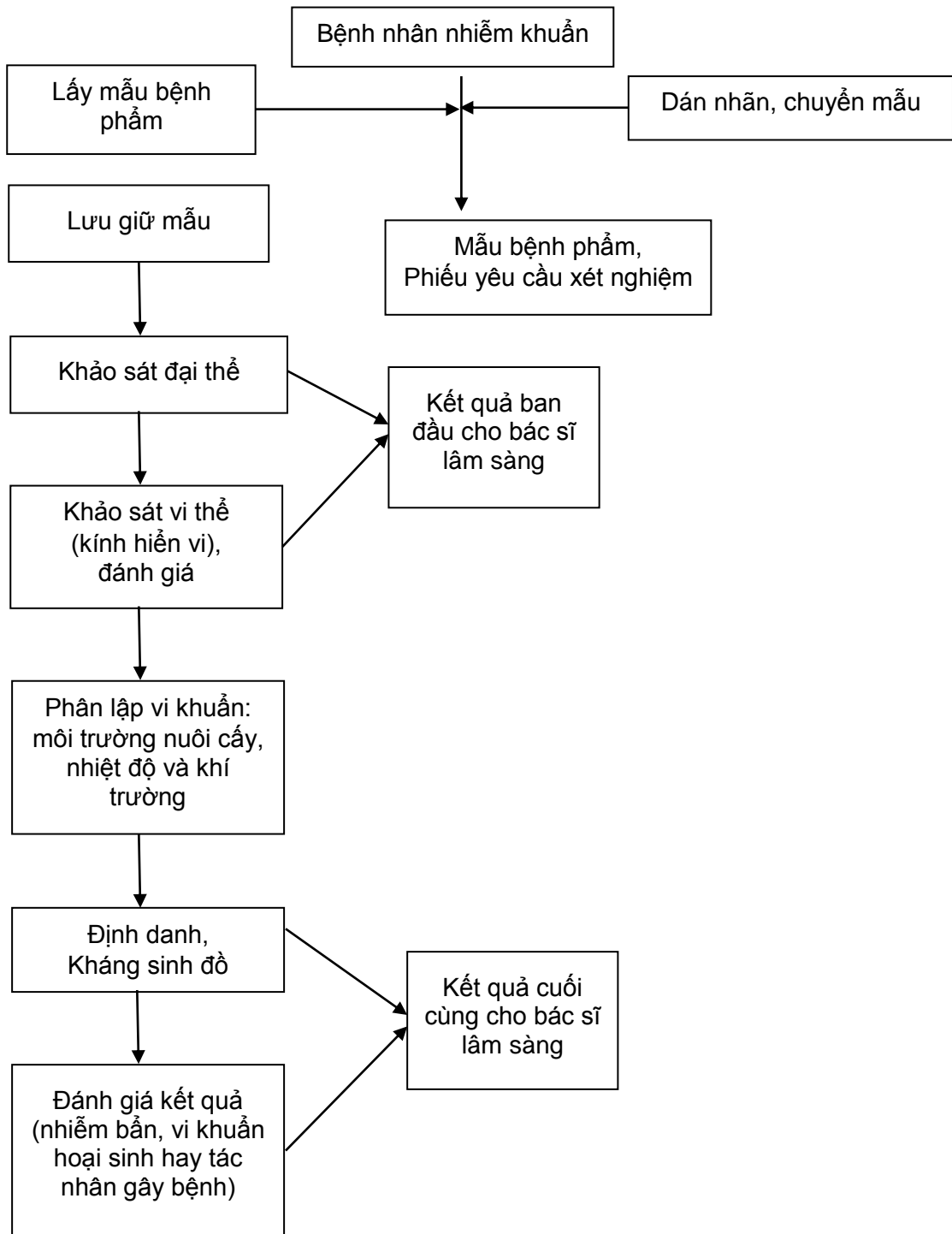
### **c. Đánh giá và báo cáo kết quả**

- Sau khi nhận các báo cáo kết quả xét nghiệm từ các phòng xét nghiệm tham gia ngoại kiểm tra, kết quả đúng của đợt khảo sát nên được gửi càng sớm càng tốt đến các phòng xét nghiệm.

- Báo cáo kết quả cuối cùng kèm theo bảng phân tích kết quả nên được gửi đến các phòng xét nghiệm tham gia ngoại kiểm tra trong vòng một tháng.

- Mỗi phòng xét nghiệm tham gia sẽ có một mã định danh và một bảng điểm riêng của mình; đồng thời phòng xét nghiệm cũng có thể tham khảo và so sánh với kết quả của các phòng xét nghiệm khác (không nêu tên của phòng xét nghiệm).

## PHỤ LỤC 1. CÁC BƯỚC KHẢO SÁT BỆNH NHÂN NHIỄM KHUẨN CỦA PHÒNG XÉT NGHIỆM VI SINH



## PHỤ LỤC 2. KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG TRANG THIẾT BỊ CHỦ YẾU CỦA PHÒNG XÉT NGHIỆM VI SINH

Trang thiết bị	Bảo dưỡng thường qui	Giám sát	Bảo dưỡng kỹ thuật, kiểm tra
Lò hấp ước (Autoclave)	Vệ sinh và thay nước mỗi tháng.	Kiểm tra và điều chỉnh mực nước mỗi lần hấp. Ghi nhận thời gian, nhiệt độ hoặc áp suất mỗi lần hấp. Ghi nhận kết quả nội kiểm tra chất lượng bằng chỉ thị sinh học mỗi tuần.	Mỗi 6 tháng.
Máy ly tâm (Centrifuge)	Lau thành trong của máy bằng dung dịch tiệt khuẩn hàng tuần hoặc sau mỗi lần có sự cố bể ống nghiệm hoặc tràn vãi bên trong máy.	Ghi nhận hồ sơ.	Thay “chổi than” mỗi năm.
Tủ sấy khô (Hot-air Oven)	Vệ sinh bên trong máy mỗi tháng.	Ghi nhận thời gian, nhiệt độ mỗi lần tiệt khuẩn.	Mỗi 6 tháng.
Tủ ủ ấm (Incubator)	Vệ sinh thành bên trong và kệ của máy mỗi tháng.	Ghi nhận nhiệt độ khi bắt đầu ngày làm việc (khoảng $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).	Mỗi 6 tháng.
Kính hiển vi (Microscope)	Lau sạch vật kính bằng giấy lau kính chuyên dụng sau mỗi ngày làm việc. Đậy kín bằng tấm phủ khi không sử dụng.	Kiểm tra độ tụ của kính mỗi tháng. Có biện pháp chống ẩm tốt để phòng nấm mốc.	Mỗi năm.
Tủ lạnh (Refrigerator)	Làm vệ sinh và xả đông mỗi 2 tháng hoặc sau khi bị mất điện.	Ghi nhận nhiệt độ mỗi buổi sáng trước khi bắt đầu ngày làm việc (khoảng $2 - 8^{\circ}\text{C}$ ).	Mỗi 6 tháng.
Bể ủ nhiệt (Water Bath)	Vệ sinh thành bên trong và thay nước mỗi tháng.	Kiểm tra mực nước mỗi ngày. Ghi nhận nhiệt độ vào ngày ngày đầu của mỗi tuần (khoảng $55 - 57^{\circ}\text{C}$ ).	Mỗi 6 tháng.

### PHỤ LỤC 3: BẢNG GHI NHẬN NHIỆT ĐỘ CỦA THIẾT BỊ

Mã thiết bị: Lưu:  Mẫu BP  Hóa chất  Khác:.....

Loại tủ (2-8°C):

Người quản lý: **Mã nhiệt kế: Hệ số hiệu chỉnh:**

Ngày	1		2		3		4		5		6		7		...	25		26		27		28		29		30		31		
T°	S	C	S	C	S	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
15																														
14																														
13																														
12																														
11																														
10																														
9																														
8																														
7																														
6																														
5																														
4																														
3																														
2																														
1																														
0																														
-1																														
-2																														
-3																														
-4																														
-5																														
Kiểm tra																														

Thời gian ghi nhiệt độ: Thứ 2, 3, 4, 5, 6, 7, CN

Ghi chú:.....  
 .....

## PHỤ LỤC 4. DANH SÁCH CÁC VI KHUẨN LƯU GIỮ DÙNG ĐỂ KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

### Cầu khuẩn Gram dương

*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 hoặc 33186)  
*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)  
*Staphylococcus epidermidis*  
*Streptococcus agalactiae*  
*Streptococcus mitis*  
*Streptococcus pneumoniae*  
*Streptococcus pyogenes*  
 Vi khuẩn Gram âm khó nuôi cấy  
*Moraxella catarrhalis*  
*Haemophilus influenzae* type b  
     b-lactamase-negative  
     b-lactamase-positive  
*Haemophilus parainfluenzae*  
*Neisseria gonorrhoeae*  
*Neisseria meningitidis*

### Vi khuẩn đường ruột

*Citrobacter freundii*  
*Enterobacter cloacae*  
*Escherichia coli* (ATCC 25922)  
*Klebsiella pneumoniae*  
*Proteus mirabilis*  
*Salmonella typhimurium*  
*Serratia marcescens*  
*Shigella flexneri*  
*Yersinia enterocolitica*  
 Trục khuẩn Gram âm khác  
*Acinetobacter iwoffii*  
*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)  
*Vibrio cholerae* (non-01)  
 Vi nấm  
*Candida albicans*

## PHỤ LỤC 5. DANH MỤC THỬ NGHIỆM THƯỜNG SỬ DỤNG ĐỂ KIỂM TRA HIỆU NĂNG MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY

Môi trường	Thời gian ủ	Vi khuẩn kiểm tra	Kết quả mong đợi
Bile esculin agar	24 giờ	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>A-haemolytic Streptococci</i>	VK mọc và có màu đen VK không mọc, tan máu (tiêu huyết)
Thạch máu (blood agar)	24 giờ, CO <sub>2</sub>	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	VK mọc, tan máu (tiêu huyết) β VK mọc, tan máu (tiêu huyết) α
Thạch nâu (chocolate agar)	24 giờ, CO <sub>2</sub>	<i>Haemophilus influenzae</i>	VK mọc
Decarboxylase (có phủ dầu) Lysine		<i>Salmonella</i>	Dương tính

Môi trường	Thời gian ủ	Vi khuẩn kiểm tra	Kết quả mong đợi
Ornithine	48 giờ	<i>typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Âm tính Dương tính Âm tính
Dihydrolase Arginine	48 giờ	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Dương tính Âm tính
Kligler iron agar (Triple sugar iron agar)	24 giờ	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Acinetobacter spp</i>	<sup>a</sup> A/A sinh hơi và H <sub>2</sub> S <sup>a</sup> K/A sinh hơi và H <sub>2</sub> S <sup>a</sup> A/A sinh hơi Không thay đổi
Mac Conkey agar (có crystal violet)	24 giờ	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> <i>E. faecalis</i>	Khuẩn lạc (khóm) màu hồng/đỏ Khuẩn lạc (khóm) không màu, không mọc tràn Không mọc
Malonate broth	24 giờ	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Âm tính (xanh lá cây) Dương tính (xanh da trời)
Mannitol salt agar	24 giờ	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>E. coli</i>	Khuẩn lạc (khóm) màu vàng Khuẩn lạc (khóm) màu hồng/đỏ Không mọc
Methyl red / Voges-Proskauer	48 giờ	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Dương tính / Âm tính Âm tính / Dương tính
Mueller-Hinton agar	24 giờ	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Đường kính vòng kháng khuẩn trong khoảng giới hạn chấp nhận được (theo tiêu chuẩn quốc tế)
Nitrate broth	24 giờ	<i>E coli</i> <i>Acinetobacter spp</i>	Dương tính Âm tính
Phenylalanine deaminase ferrichloride	24 giờ	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>	Âm tính Dương tính



Môi trường	Thời gian ủ	Vi khuẩn kiểm tra	Kết quả mong đợi
<i>Salmonella-Shigella</i> agar	24 giờ	<i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Không mọc Khuẩn lạc (khóm) không màu Khuẩn lạc (khóm) không màu
Selenite broth	24 giờ	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>E. coli</i>	VK mọc sau khi cấy chuyển VK không mọc sau khi cấy chuyển
Simmon citrate agar (ủ với nắp vặn không chặt)	48 giờ	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	VK không mọc VK mọc, chuyển màu xanh da trời
Thayer-Martin agar	24 giờ, CO <sub>2</sub>	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcci</i> <i>E. coli</i> <i>Candida albicans</i>	VK mọc VK mọc VK không mọc VK không mọc VK không mọc
Urea agar	24 giờ	<i>E coli</i> <i>P. mirabilis</i>	Âm tính Dương tính (màu hồng cánh sen)

<sup>a</sup>A/A: lên men lactose; K/A: không lên men lactose

## PHỤ LỤC 6. YÊU CẦU VỀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG MỘT SỐ SINH PHẨM THƯỜNG SỬ DỤNG

Sinh phẩm / Thuốc nhuộm	Chủng vi khuẩn sử dụng để kiểm tra		Môi trường
	Dương tính	Âm tính	
Đĩa giấy Bacitracin	<i>S. pyogenes</i> (đường kính)	<i>E. faecalis</i>	Thạch máu
Catalase	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	Tryptic soy agar
Huyết tương (thử nghiệm Coagulase)	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Tryptic soy agar
$\beta$ -glucuronidase (PGUA) <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Tryptic soy agar
Nhuộm Gram	<i>Staphylococci</i>	<i>E. coli</i>	Phiến phết vi khuẩn
ONPG <sup>b</sup>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	Triple sugar iron agar / Kligler iron agar
Đĩa giấy Optochin	<i>S. pneumoniae</i> (đường kính)	<i>Streptococcus mitis</i>	Thạch máu
Oxidase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	Tryptic soy agar
Đĩa giấy Tellurite	<i>E. faecalis</i> (không có vòng)	<i>S. agalactiae</i> (có vòng)	Thạch máu
Đĩa giấy “yếu tố V”	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. influenzae</i>	Tryptic soy agar
Đĩa giấy “yếu tố XV”	<i>H. influenzae</i>		Tryptic soy agar
Thuốc nhuộm Ziehl - Neelsen	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hỗn hợp VK hoại sinh	Phiến phết đờm (đàm) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosiduronic acid (PGUA)

<sup>b</sup> O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

<sup>c</sup> Chuẩn bị một vài phiến phết đờm (đàm) từ bệnh nhân đã biết dương tính và âm tính. Có định bằng hơi nóng. Bọc giấy và lưu giữ ở tủ lạnh.

## PHỤ LỤC 7. PHIẾU GHI NHẬN VÀ THEO DÕI KẾT QUẢ KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG ĐĨA GIẤY KHÁNG SINH

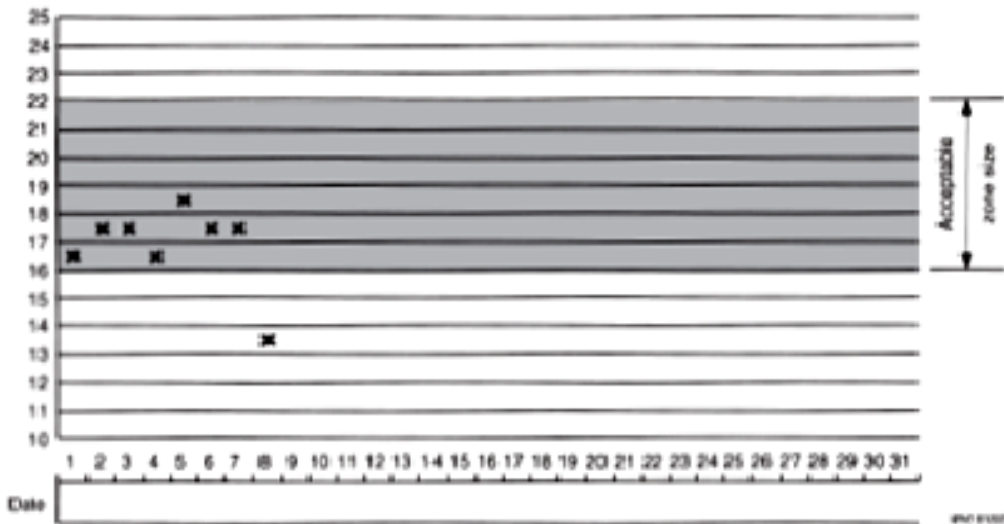
Chủng vi khuẩn sử dụng: ..... Tháng ..... Năm .....

Ngày kiểm tra	Tên kháng sinh	Số lô sản xuất	Ngày hết hạn	Đường kính vòng vô khuẩn	Giới hạn cho phép (CLSI*)	Đánh giá kết quả	Người đánh giá	Ghi chú
	Ampicillin			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		
	Aztreonam			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		
	Cefotaxime			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		
	Ceftazidime			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		
	Cefuroxime			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		
	Cefotaxim/ Clav.acid			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		
	Ceftazidime/ Clav.acid			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		
	Cefpodoxim			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		
	Chloramphenicol			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		
	Nalidixic acid			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không		

Ngày kiểm tra	Tên kháng sinh	Số lô sản xuất	Ngày hết hạn	Đường kính vòng vô khuẩn	Giới hạn cho phép (CLSI*)	Đánh giá kết quả	Người đánh giá	Ghi chú
						đạt		
	Nitrofurantoin			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		
	Norfloxacin			.....mm	.....	<input type="checkbox"/> Đạt <input type="checkbox"/> Không đạt		

**Ghi chú:** (\*) Sử dụng giá trị giới hạn đối với từng chủng vi khuẩn / từng loại kháng sinh và phải được cập nhật hàng năm

Biểu đồ JL theo dõi kết quả kiểm soát chất lượng đĩa giấy kháng sinh.....



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AMS (2010), “Clinical microbiology procedures handbook”, Third edition.
2. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO, 2003.
3. Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology
4. Bộ Y Tế - Hà Nội (2000), “Tài liệu Vi Sinh Lâm Sàng”, trang XX.
5. Bộ Y Tế - Hà Nội (2012), “Xét nghiệm một số vi sinh vật gây bệnh truyền nhiễm”, trang 109-116.
6. Bộ Y tế (2005), Tiêu chuẩn thiết kế các khoa xét nghiệm bệnh viện đa khoa (52TCN-CTYT 37: 2005). Ban hành kèm theo Quyết định 35/2005/QĐ-BYT.
7. Bộ Y tế (2006) Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng: Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
8. Bộ Y tế (2011), Thông tư số 43/2011/TT-BYT quy định Chế độ quản lý mẫu bệnh phẩm bệnh truyền nhiễm, ngày 05 tháng 12 năm 2011.
9. Bộ Y tế (2012), Thông tư số 07/2012/TT-BYT quy định Danh mục vi sinh vật gây bệnh truyền nhiễm theo nhóm nguy cơ và cấp độ an toàn sinh học phù hợp kỹ thuật xét nghiệm, ngày 14 tháng 5 năm 2012.
10. Bộ Y tế (2012), Thông tư số 25/2012/TT-BYT ban hành Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về thực hành và an toàn sinh học tại PXN, ngày 29 tháng 11 năm 2012.
11. Bộ Y tế (2012), Thông tư số 29/2012/TT-BYT quy định Thủ tục cấp mới, cấp lại giấy chứng nhận PXN đạt tiêu chuẩn an toàn sinh học, ngày 04 tháng 12 năm 2012.
12. Bộ Y tế, Bộ Tài nguyên và môi trường (2015), Thông tư liên tịch số 58/2015/TTLT-BYT-BTNMT quy định về quản lý chất thải y tế.
13. CEN Workshop Agreement (2011), Laboratory biorisk management, CWA 15793: 2011.
14. Centers for Disease Control and Prevention (2009), Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112.
15. Chính phủ (2010), Nghị định số 92/2010/NĐ-CP Quy định chi tiết thi hành Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, ngày 30 tháng 8 năm 2010.
16. Chính phủ (2016), Nghị định số 103/2016/NĐ-CP Quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm.

17. *Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013. Quality Management System- Development and Management of Laboratory Documents; Approved guideline 6th Edition, p.9-10.*
18. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard-Tenth edition. M07-A10. Vol. 35 No. 2. 2015.*
19. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. M100S. 26<sup>th</sup> edition. 2016.*
20. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; Approved Standards - Twelfth edition. M02-A12. Vol. 35 No. 1. 2015.*
21. *Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3 rd Edition - Lynne S.Garcia & Henry D.Isenberg.*
22. *Connie R. Mahon, Donald C. Lehman, George Manuselis Textbook of diagnostic microbiology. 5th edition. Saunders Elsevier. 2015:274-312.*
23. *Fleming D. O. and Hunt D. L. (2006), Biological Safety: Principles and Practices, 4th Edition, ASM Press, pp. 53-81.*
24. *Garcia L. S. et al, (2010) Clinical Microbiology Procedure Handbook, 3rd Ed.*
25. *Giáo trình Vi sinh y học. (Nhà xuất bản y học, 2007)*
26. *Medical laboratories - Requirements for quality and competence. ISO 15189:2012, 3rd edition.*
27. *Perilla J.M. et al (2003) Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World.*
28. *Public Health Agency of Canada (2004), Laboratory Biosafety Guidelines, 3rd Edition.*
29. *Quality Management System: A Model for Laboratory Services; Approved Guideline. GP26-A4. Fourth edition, 2011.*
30. *Queensland Health Organization (2007) Manual for Urine culture and Interpretation.*
31. *Quốc hội Việt Nam (2007), Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm, NXB Chính trị Quốc gia, Hà Nội.*
32. *Richard S, Lynn S-M, Avery CG. Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC Press. 2007: 53-89.*

33. *Tăng Kim Hồng. Dịch tễ học trong nghiên cứu khoa học. Nhà xuất bản Hồng Đức, 2013.*
34. *Textbook of diagnostic microbiology 5th Edition*
35. *Textbook of diagnostic microbiology. Connie R. Mahon, Donald C. Lehman, George Manuselis. 5th edition. Saunders Elsevier. 2015:274-312.*
36. *Thông tư số 25/2012/TT-BYT, ngày 29/11/2012 về Ban hành qui chuẩn kỹ thuật quốc gia về thực hành và an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm.*
37. *Thông tư số 33/2016/TT-BYT, ngày 19/9/2016 về Qui định tổ chức và hoạt động xét nghiệm vi sinh trong bệnh viện.*
38. *UK Standard for Microbiology Investigation 2014.*
39. *WHO (2004), Laboratory Biosafety Manual, 3rd Edition.*
40. *WHO: Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. J. Vandepitte and J. Verhaegen et al. 2nd edition, 2003.*
41. *WHO: Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. Mindy J. Perilla et al. 2003.*
42. *World Health Organization (2003) Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. 2nd*
43. *World Health Organization (2004), Laboratory biosafety manual, Third edition.*
44. *World Health Organization, 2011. Laboratory Quality Management System - Handbook, Document and Record, p.181.*
45. *World Health Organization, 2011. Laboratory Quality Standards and their Implementation-South-East Asia Region, Annex 5, p.39-45.*