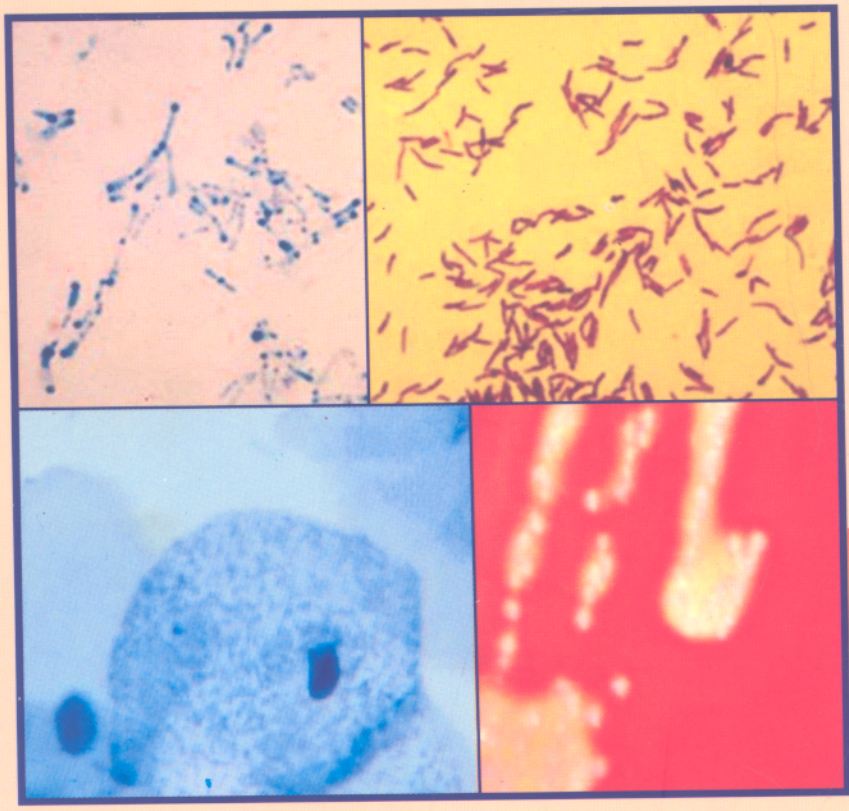
BỘ Y TẾ

# KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM VI SINH LÂM SÀNG



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

BỘ Y TẾ

# KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM VI SINH LÂM SÀNG

*(Sách dùng Đào tạo Cử nhân Kỹ thuật y học)*

*Mã số: ĐK.01.W.10*

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC
HÀ NỘI - 2006

**CHỈ ĐẠO BIÊN SOẠN:**

Vụ khoa học Đào tạo – Bộ Y tế

**TÁC GIẢ:**

TS.BS. Phạm Hùng Vân

**THAM GIA TỔ CHỨC BẢN THẢO**

ThS. Phí Văn Thâm và Ban thư ký HĐTĐSGK và TLDH

**© Bản quyền thuộc Bộ Y tế (Vụ khoa học và Đào tạo)**

# LỜI GIỚI THIỆU

Thực hiện Nghị định 43/2000/NĐ - CP ngày 30/8/2000 của Chính phủ quy định chi tiết và hướng dẫn triển khai luật Giáo dục, Bộ Giáo dục và Đào tạo, Bộ Y tế đã ban hành chương trình khung đào tạo Cử nhân Kỹ thuật y học. Bộ Y tế tổ chức biên soạn bộ tài liệu dạy học các môn học cơ sở và chuyên môn theo chương trình mới nhằm từng bước xây dựng bộ sách chuẩn trong cộng tác đào tạo Cử nhân Kỹ thuật y học.

Sách kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng được biên soạn theo chương trình khung đã được phê duyệt. Năm 2005, cuốn sách này được Hội đồng chuyên môn thẩm định sách giáo khoa và tài liệu dạy học của Bộ Y tế thẩm định. Bộ Y tế thống nhất sử dụng là tài liệu dạy học chính thức của ngành trong giai đoạn hiện nay. Trong thời gian từ 3 đến 5 năm, sách cần được chỉnh lý, bổ sung và cập nhật. Tài liệu được biên soạn gồm 21 bài, mỗi bài có mục tiêu học tập và các nội dung thiết yếu. Trong đó, nội dung thể hiện được các yêu cầu: kiến thức cơ bản, chính xác khoa học,cập nhật được tiến bộ khoa học hiện tại và thực tiễn Việt Nam. Sách dùng để đào tạo Cử nhân Kỹ thuật y học đồng thời cũng là tài liệu tham khảo tốt cho sinh viên các chuyên ngành khác và các cán bộ y tế quan tâm đến công tác xét nghiệm.

Vụ Khoa học Đào tạo, Bộ Y tế xin chân thành cảm ơn TS.BS. Phạm Hùng Vân các giảng viên Trường Đại học Y Dược TPHCM đã tích cực tham gia biên soạn cuốn sách này. Cuốn sách này được viết lần đầu và đang dần từng bước hoàn thiện nên nội dung biên soạn không tránh khỏi những thiếu sót và cần được bổ xung. Vụ Khoa học và Đào tạo mong nhận được nhiều ý kiến đóng góp của độc giả và đồng nghiệp để cuốn sách này càng hoàn thiện hơn.

**VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

# LỜI NÓI ĐẦU

Khác với thử nghiệm sinh hoá và huyết học tại bệnh viện là các thử nghiệm mà ngày hôm nay chỉ có khâu lấy mẫu trên bệnh nhân là phải làm bằng tay còn tất cả các công đoạn còn lại đều có thể thực hiện được trên máy tự động, xét nghiệm vi sinh lâm sàng là một loại xét nghiệm vẫn còn có đa số các bước thực hiện phải làm bằng tay và không chỉ thế là một xét nghiệm đòi hỏi người làm xét nghiệm phải có một kiến thức rất hệ thống và khá toàn diện để có thể quyết định được các bước đi tiếp theo trong tiến trình làm xét nghiệm cho đến khi có kết quả chung cuộc. Ngay cả khi có được kết quả chung cuộc, việc đánh giá và biện luận kết quả như thế nào để hữu dụng nhất cho lâm sàng cũng đòi hỏi người làm xét nghiệm phải có những hiểu biết tối thiểu về khía cạnh vi sinh trong lâm sàng. Chính vì những lý do vậy nên vi sinh lâm sàng là một xét nghiệm cho đến ngày hôm nay có thể nói là chậm phát triển nhất so với các xét nghiệm khác tại các phòng thí nghiệm lâm sàng tại các bệnh viện của chúng ta. Trong lĩnh vực giảng dạy cũng vậy, do sự thiếu thốn các phương tiện và thiết bị nên các kiến thức cũng như thực hành vi sinh lâm sàng được giảng dạy cho các sinh viên cũng còn rất nghèo nàn, chắp vá và thiếu hệ thống; và cũng chính như vậy đã ảnh hưởng thêm đến chất lượng kém cỏi của các xét nghiệm vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện hiện nay.

Với 27 năm kinh nghiệm trong giảng dạy cũng như làm việc trong lĩnh vực vi sinh lâm sàng, tác giả đã cố gắng tổng kết và hệ thống các kiến thức cần thiết nhất và cơ bản nhất để giúp các sinh viên cũng như các nhà vi sinh lâm sàng có thể nắm được khi xây dựng, thực hành các xét nghiêm vi sinh lâm sàng cũng như khi biện luận các kết quả mà các xét nghiệm vi sinh lâm sàng mang lại. Các kiến thức này được trình bày trong nhiều phần, trong đó phần đầu tiên là các kỹ thuật lấy và làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng các bệnh phẩm khác nhau được trình bày trong cuốn sách này, các phần còn lại sẽ liên quan đến việc định danh các vi khuẩn gây bệnh thường phân lập được từ các bệnh phẩm khác nhau và các kỹ thuật kháng sinh đồ thường qui được thực hiện tại các phòng thí nghiệm bệnh viện đang được viết và sẽ được tác giả đưa ra trong một thời gian ngắn sắp tới.

Tác giả luôn cho rằng một nhà vi sinh lâm sàng đứng trước một bệnh phẩm cần phải làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng giống như một bác sĩ điều trị đứng trước một bệnh nhân cần phải được chẩn đoán và điều trị. Bác sĩ cần phải chẩn đoán đúng bệnh mà bệnh nhân đang mắc phải để đưa ra được điều trị đúng và thích hợp cũng giống như nhà vi sinh lâm sàng trước một bệnh phẩm phải đưa ra được một

qui trình xét nghiệm thích hợp để thực hiện theo đúng tiến trình và cuối cùng có một kết quả xét nghiệm vi sinh lâm sàng hữu dụng được cho lâm sàng. Trong các bước xét nghiệm vi sinh lâm sàng phải thực hiện, bước lấy bệnh phẩm và làm các bệnh phẩm là quyết định nhất cho sự thành bại của kết quả xét nghiệm. Chính vì vậy, tác giả hy vọng rằng cuốn các kỹ thuật lấy và làm các bệnh phẩm khác nhau để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng này sẽ đáp ứng được phần nào yêu cầu của các nhà vi sinh lâm sàng trong nước cũng như các sinh viên khoa kỹ thuật y khoa để xây dựng được cơ sở của các xét nghiệm vi sinh lâm sàng cũng như các phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện của chúng ta hiện nay.

Dĩ nhiên sách cũng không thể nào tránh được các sơ sót về kiến thức, về ngữ pháp, và cả về in ấn. Tác giả chân thành ước mong được nhận sự đóng góp của qúi độc giả.

**TS. BS. PHẠM HÙNG VÂN**

# MỤC LỤC


| | |
|---|---|
| Mẫu máu và cấy máu | 7 |
| Các mẫu mủ, chất dịch và cấy mủ, chất dịch | 18 |
| Mẫu phân và cấy phân | 25 |
| Mẫu nước tiểu và cấy nước tiểu | 34 |
| Dịch não tủy | 43 |
| Mẫu quệt hầu, họng và cấy mẫu quét hầu họng | 53 |
| Bệnh phẩm tai, mắt, mũi, xoang và cấy bệnh phẩm tai mắt mũi xoang | 59 |
| Đờm, dịch hút đờm qua mũi, dịch hút rửa phế quản qua nội soi và cấy đờm, bệnh phẩm chứa đờm | 67 |
| Cấy định lượng mẫu đờm | 78 |
| Mẫu bệnh phẩm sinh dục và cấy mẫu lấy từ đường sinh dục | 84 |
| Cấy kỵ khí và cấy mẫu bệnh phẩm kỵ khí | 92 |
| Khảo sát trực tiếp | 101 |
| Nhuộm GRAM | 105 |
| Nhuộm METHYLEN BLUE kiềm | 109 |
| Nhuộm kháng ACID | 111 |
| Thử nghiệm LAL phát hiện ENDOTOXIN (limulus amebocytes lysate) | 116 |
| Kiểm tra vi sinh không khí | 121 |
| Thử nghiệm huyết thanh học | 124 |
| Thử nghiệm hoá miễn dịch học | 126 |
| Đánh giá một thử nghiệm dùng để phát hiện một tác nhân gây bệnh | 131 |
| Trang bị cơ bản cho một phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng | 138 |
| Tài liệu tham khảo | 143 |
| Phụ lục A: Bảng tra cứu các sơ đồ và qui trình làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng các bệnh phẩm khác nhau | 144 |
| Phụ lục B: Bảng tra cứu các hình ảnh minh hoạ | 144 |
| Phụ lục C: Bảng tóm tắt các vật liệu lấy mẫu và môi trường phân lập tương ứng cho các bệnh phẩm khác nhau. | 145 |

# BÀI 1. MẪU MÁU VÀ CẤY MÁU

**MỤC TIÊU**

1. *Giúp được lâm sàng cho các chỉ định cấy máu thích hợp nhất vì biết được chỉ định cấy máu và thời điểm tốt nhất để thực hiện cấy máu.*
2. *Thực hiện đúng cách xét nghiệm cấy máu vì biết được cách thực hiện cấy máu như thế nào, bao gồm thể tích máu nên lấy để cấy bao nhiêu, nên cấy máu mấy lần?...*
3. *Lựa chọn được phương tiện thích hợp nhất cho cấy máu trong các bệnh viện hiện nay nhờ biết được phương tiện (môi trường) phù hợp nhất để cấy máu.*
4. *Thực hiện tốt qui trình theo dõi cấy máu và cho các kết quả chính xác - kịp thời đến lâm sàng vì biết được qui trình theo dõi cấy máu.*
5. *Biện luận được một cách chính xác kết quả cấy máu vì biết được các vi khuẩn thường gặp trong cấy máu là các vi khuẩn nào? Làm thế nào để có thể nhận biết được một cấy máu dương tính thật sự với một cấy máu dương tính do ngoại nhiễm.*

## 1. CHỈ ĐỊNH CẤY MÁU

- Phải chỉ định cấy máu trước các trường hợp nhiễm trùng có thể có ***du khuẩn huyết tạm thời*** (transient bacteremia) hay ***nhiễm trùng huyết*** (septicemia)...
- Do vậy, nên chỉ định cấy máu trước các bệnh nhân có một trong các triệu chứng như ***sốt***, ***ớn lạnh***, ***lạnh run***, ***tiếng thổi tim*** (cardiac murmur) nghi ngờ viêm nội tâm mạc, có ***xuất huyết ở da hay niêm mạc***, ***xuất huyết dạng sao*** (splinder) trên móng tay, choáng.

## 2. THỜI ĐIỂM CẤY MÁU

- Phải cấy máu ***trước khi bệnh nhân dùng kháng sinh hệ thống***. Trong bệnh viện, bác sĩ phải cho cấy máu trước khi bắt đầu cho bệnh nhân dùng kháng sinh.
- Tuy nhiên trong các trường hợp bệnh nhân đang điều trị kháng sinh nhưng các triệu chứng của du khuẩn huyết hay nhiễm trùng huyết vẫn không thuyên giảm thì bác sĩ cũng nên cho chỉ định cấy máu để phát hiện tác nhân vi khuẩn gây nhiễm trùng.

- Thời điểm tốt nhất để cấy máu là khi bệnh nhân ***bị ớn lạnh*** hay ***đang lạnh run*** trước khi sốt, hay lúc bệnh nhân ***đang lên cơn sốt***...
- Có thể cấy máu ***2 lần*** trong vòng ***1 giờ đầu*** và thực hiện cấy máu tại 2 vị trí lấy máu khác nhau trên cơ thể (ví dụ: lần đầu lấy máu tay phải thì lần sau lấy máu ở tay trái).

## 3. CÁCH LẤY MÁU ĐỂ CẤY

- Lấy máu tĩnh mạch bằng phương pháp vô trùng (sát trùng da bằng cồn 70%, chờ khô rồi mới chọc kim lấy máu).
- Thể tích máu được lấy để cấy nên chiếm 1/10 hay tối đa là 1/5 thể tích môi trường cấy máu. Thông thường lấy 3-10ml máu để cấy vào môi trường cấy máu có thể tích 50ml. Đối với trường hợp bệnh nhân là trẻ em, lấy khoảng 2-3ml máu để cấy là vừa.

## 4. MÔI TRƯỜNG CẤY MÁU

- BHI, TSB hay Columbia broth, cho vi khuẩn hiếu khí.
- Để cấy kỵ khí, thêm vào môi trường các chất khử như Thioglycollat, L-cystein.
- Để kháng đông, tốt nhất là dùng Sodium Polyanethol Sulfonat (SPS), nếu không có thì dùng citrat hay heparin.

## 5. THEO DÕI CẤY MÁU

- Chai cấy máu được ủ trong tủ ấm 35°C hay 37°C và theo dõi mỗi ngày trong 5-7 ngày xem có dấu hiệu có vi khuẩn mọc hay không trong môi trường cấy máu lỏng, đó là: (1) Có hạt đóng trên mặt hồng cầu, (2) Đục đều hay có màng, (3) Tan huyết, (4) Đông huyết tương, (5) Có gas, (6) Có hạt trắng trong lớp hồng cầu hay mặt lớp hồng cầu.
- Nếu là chai cấy máu có 2 pha thì trước khi ủ và mỗi ngày sau khi quan sát mặt thạch của pha đặc xem có khóm vi khuẩn mọc hay không? Nếu không có khóm vi khuẩn mọc trên pha đặc, tráng pha lỏng lên pha đặc. Có một số vi khuẩn rất dễ bị ly giải sau khi mọc trong môi trường lỏng như *S. pneumoniae*, hay khó mọc thành khóm trên pha đặc như *Streptococci*, do đó nên làm một cấy truyền mù lên mặt thạch (thạch máu hay thạch nâu, sau đó ủ trong tủ ấm $CO_2$ hay bình nến) sau khi ủ chai cấy máu qua đêm hoặc sau 24 giờ.
- Bất cứ lúc nào phát hiện có dấu hiệu vi khuẩn mọc (trên pha đặc thấy có khóm vi khuẩn mọc, hay trên pha lỏng thấy có một trong các dấu hiệu vi

khuẩn mọc như kể trên) hay nghi ngờ vi khuẩn mọc, tiến hành cấy phân lập ngay, tốt nhất là trên thạch bổ dưỡng nhất là thạch nâu có bổ sung XV (CAXV = Chocolate Agar Isovitex), nếu không có thì cấy trên thạch máu (BA) hay thạch nâu (CA), đồng thời làm một phết nhuộm gram khảo sát trực tiếp. Nếu kết quả nhuộm gram thấy có vi khuẩn, có thể làm kháng sinh đồ trực tiếp từ chai cấy máu. Nếu trên pha đặc có vi khuẩn mọc thì tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ ngay.

- Sau 5 ngày theo dõi chai cấy máu, phải cấy truyền mù một lần nữa để chắc chắn không có vi khuẩn mọc trong chai cấy máu trước khi trả lời cấy máu âm tính.

## 6. CÁC VI KHUẨN HAY VI NẤM THƯỜNG LÀ TÁC NHÂN NHIỄM KHUẨN HUYẾT HAY NHIỄM NẤM HUYẾT

- Gram (-)
  - + *Escherichia Coli*
  - + *Klebsiella spp*
  - + *Enterobacter spp*
  - + *Proteus spp*
  - + *Samonella typhi*
  - + *Samonella* (ngoài *S. typhi*)
  - + *Pseudomonas aeruginosa*
  - + *Neisseria meningitidis*
  - + *Haemophilus influenzae*
  - + *Bacteroides fragilis*
  - + *Brucella spp*
  - + *Pseudomonas pseudomallei*

- Gram (+) và nấm men
  - + *Staphylococcus aureus*
  - + *S. epidermidis*
  - + *S. pyogenes* (nhóm A)
  - + *S. agalactiae* (nhóm B)
  - + *Streptococci* tiêu huyết α (viridans)
  - + *Streptococcus pneumoniae*
  - + *E. faecalis* (nhóm D)
  - + *Listeria monocytogenes*
  - + *Clostridium perfringens*
  - + *Peptococcus spp*
  - + *Peptostreptococcus spp*
  - + *Candida albicans*

  và các nấm men khác

## 7. VẤN ĐỀ VI KHUẨN NGOẠI NHIỄM

Các vi khuẩn ngoại nhiễm có thể

- Từ da:
  - + *Staphylococcus epidermidis,*
  - + *Propionobacterium acnes,*
  - + *Diphtheroides.*

- Từ môi trường xung quanh:
  + *Clostridium spp.*
  + *Acinetobacter spp.*
  + *Bacillus spp.*
- Loại trừ được ngoại nhiễm khi kết quả cấy máu cho thấy vi khuẩn:
  + Cùng phân lập được từ hai chai cấy máu cấy từ một bệnh nhân.
  + Cùng phân lập được từ một bệnh phẩm khác cũng trên bệnh nhân đó.
  + Vi khuẩn mọc nhanh (trong vòng 48 giờ).
  + Các dòng vi khuẩn có cùng type sinh học và đề kháng như nhau với kháng sinh được cấy từ hai chai cấy máu khác nhau trên cùng một bệnh nhân.

## 8. TRẢ LỜI KẾT QUẢ CẤY MÁU DƯƠNG TÍNH

Tất cả các vi khuẩn mọc được trong chai cấy máu đều phải trả lời cho bác sĩ điều trị. Tham khảo với bác sĩ lâm sàng để rút kinh nghiệm trong các trường hợp ngoại nhiễm. Các vi khuẩn nghi là ngoại nhiễm, không cần thiết phải làm kháng sinh đồ và thông báo cho bác sĩ biết sự nghi ngờ này. Phải thường xuyên thông báo cho bác sĩ lâm sàng biết các kết quả tạm thời bất cứ khi nào thấy có dấu hiệu vi khuẩn mọc bằng các phiếu trả lời kết quả tạm thời.

## 9. CẤY MÁU – CÁC CÂU HỎI THƯỜNG GẶP

### 9.1. Trên thực tế, tỷ lệ cấy máu dương tính tại các bệnh viện rất thấp, có phải là do chỉ định cấy máu quá rộng rãi không?

- Thật sự tỷ lệ cấy máu dương tính thấp tại các bệnh viện không phải do chỉ định cấy máu quá rộng rãi mà lại là do lâm sàng ít bao giờ nghĩ đến việc cho chỉ định cấy máu sớm ngay từ đầu. Lâm sàng chỉ cho cấy máu sau khi đã thất bại điều trị kháng sinh và chính chỉ định cấy máu quá hẹp này đã làm cho tỷ lệ cấy máu dương tính tại các bệnh viện rất thấp.
- Cấy máu là một xét nghiệm vi sinh lâm sàng cần phải thực hiện trước các trường hợp bệnh nhân có chẩn đoán lâm sàng nghi ngờ có du khuẩn huyết tạm thời (nhiễm trùng hô hấp cấp...), nhiễm trùng huyết, hay có nguy cơ nhiễm trùng huyết (thương hàn, nhiễm trùng tiểu, nhiễm trùng gan mật...). Cấy máu cũng cần phải thực hiện trên các bệnh nhân có các dấu hiệu nhiễm trùng mạch máu hay tim mạch (viêm van tim cấp tính hay bán cấp, viêm nội mạc mạch máu...). Nói chung chỉ định cấy máu rất rộng rãi, có thể gần

như một chỉ định làm công thức bạch cầu trước các bệnh nhân có dấu chứng nhiễm trùng.

### 9.2. Thời điểm tốt nhất để cấy máu là khi nào và nên cấy máu mấy lần?

- Tốt nhất là cấy máu trước khi cho bệnh nhân dùng kháng sinh hệ thống. Tuy nhiên vẫn phải chỉ định cấy máu trong các trường hợp bệnh nhân đã dùng kháng sinh mà vẫn còn các dấu hiệu nhiễm trùng tiến triển.
- Thời điểm cấy máu tốt nhất là lúc bệnh nhân đang lên cơn sốt hay lúc bệnh nhân rét run. Có thể thực hiện hai lần cấy máu cách nhau 1 giờ tại 2 vị trí lấy máu khác nhau (lần đầu lấy máu tay phải, lần sau lấy máu tay trái chẳng hạn...).

### 9.3. Nên lấy thể tích máu là bao nhiêu để cấy?

- Thể tích máu được cấy là 1/10 hay tối đa là 1/5 thể tích môi trường cấy máu.
- Người lớn, mỗi lần cấy, lấy 5-10ml máu cho vào chai 50ml môi trường. Trẻ con có thể từ 1ml đến 3ml cho chai 30 đến 50ml môi trường.

### 9.4. Phương tiện nào hiện nay là thích hợp nhất cho các bệnh viện để cấy máu?

- Phương tiện cấy máu thích hợp nhất cho điều kiện của các phòng thí nghiệm lâm sàng hiện nay là chai cấy máu 2 pha do công ty Nam Khoa sản xuất. Chai cấy máu này có đủ các ưu điểm của một môi trường cấy máu lý tưởng, của phương pháp cấy máu tại giường thuận tiện, của phương pháp theo dõi để phát hiện vi khuẩn rất tiện lợi.

### 9.5. Qui trình theo dõi cấy máu được thực hiện như thế nào? Bao lâu sau thì lâm sàng sẽ có kết quả cấy máu?

- Để theo dõi cấy máu, cần phải ủ chai cấy máu trong tủ ấm 35-37°C liên tục trong 5-7 ngày. Sau ngày đầu, phải cấy mù lên hộp thạch CA để phát hiện được các vi khuẩn mọc nhanh và khó thành khóm trên mặt thạch nghiêng của chai cấy máu 2 pha, các ngày sau tráng pha lỏng lên pha đặc để cấy vi khuẩn mọc trong pha đặc lên mặt nghiêng. Bất cứ lúc nào phát hiện được vi khuẩn mọc trong pha lỏng hay trên pha đặc thì phải tiến hành định danh và kháng sinh đồ. Ngày theo dõi cuối cùng, phải cấy mù một lần nữa lên thạch CA để đảm bảo không có vi khuẩn mọc trước khi trả lời kết quả cấy máu âm tính.
- Một qui trình cấy máu và theo dõi cấy máu để trả lời kết quả cho lâm sàng tối đa là 7 ngày. Nhiều trường hợp vi khuẩn mọc nhanh, ta có thể có kết quả

trong vòng 48 giờ. Vì cấy máu cần phải có thời gian như vậy nên bất cứ lúc nào chúng ta phát hiện có vi khuẩn mọc trên chai cấy máu thì phải trả lời kết quả tạm thời cho lâm sàng trước khi cho kết quả chung cuộc.

### 9.6. Làm thế nào nhận biết được một chai cấy máu dương tính là do ngoại nhiễm

- Một kết quả cấy máu dương tính do ngoài nhiễm có thể nhận biết được khi: (1) Các vi khuẩn phân lập được là các vi khuẩn hoại sinh như *Bacillus subtilis, Bacillus cereus*...; (2) Vi khuẩn cấy được trên hai chai cấy máu trên cùng một bệnh nhân trong cùng một thời điểm hay trong hai thời điểm cách nhau 30' đến 1 giờ lại có kết quả khác nhau.
- Một kết quả cấy máu chắc chắn là dương tính thật sự khi: (1) Vi khuẩn cấy được là vi khuẩn chắc chắn gây bệnh, không thể hoại sinh như: *S. typhi*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*...; (2) Vi khuẩn mọc rất nhanh, chỉ 24 giờ sau khi cấy; (3) Vi khuẩn cấy được trên hai chai cấy máu trên cùng một bệnh nhân cho kết quả giống nhau; (4) Vi khuẩn từ cấy máu giống hệt vi khuẩn phân lập được từ một nhiễm trùng khác là nguồn gốc gây du khuẩn huyết hay nhiễm trùng huyết.

## 10. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Hãy cho biết khi nào một bệnh nhân cần phải được cấy máu?

b. Cấy máu cho bệnh nhân vào thời điểm nào là tốt nhất? Cần phải cấy bao nhiêu lần?

c. Thể tích máu được cấy là bao nhiêu và tỷ lệ máu được cấy so với môi trường cấy máu nên là bao nhiêu thì tốt?

d. Môi trường cấy máu tốt nhất là gì ? Kháng đông bằng gì là tốt nhất và tại sao?

e. Chai môi trường cấy máu thích hợp nhất cho các bệnh viện hiện nay tại Việt Nam là loại nào? Phân tích các ưu khuyết điểm của chai cấy máu này?

f. Hãy cho biết cách theo dõi một chai cấy máu 2 phase trong phòng thí nghiệm? Dấu hiệu nào cho biết chai cấy máu dương tính (có vi khuẩn mọc)? Thời gian theo dõi chai cấy máu cho đến khi trả lời được kết quả cuối cùng là bao lâu?

g. Hãy cho biết các vi khuẩn thường gặp trong cấy máu dương tính?

h. Làm thế nào có thể nhận biết được một cấy máu là dương tính thật sự hay do ngoại nhiễm?

# PHỤ LỤC 1:

## Sản phẩm liên quan: Chai cấy máu HAI PHA

### Mô tả

- Chai cấy máu **HAI PHA (BIPHASIC)** là sản phẩm từ đề tài nghiên cứu cấp bộ của TS. BS. Phạm Hùng Vân. Sản phẩm này chỉ dùng một lần (disposable), không dùng lại được. Cấu tạo (xem hình dưới) gồm các thành phần sau:
  + Chai bằng nhựa polystyren.
  + Nút cao su để chọc kim cấy máu qua, làm bằng cao su trung tính.
  + Nắp vặn bằng nhựa màu đỏ để mở nắp chai cấy máu cấy truyền khi đã có dấu hiệu vi khuẩn mọc trong pha lỏng hay trên bề mặt pha đặc.
  + Nắp che bằng nhựa màu xanh lá để bảo vệ phần nút cao su.
  + Phase đặc là mặt môi trường BHI agar (Difco, Biorad hay Merck).
  + Phase lỏng là BHI lỏng (Difco, Biorad hay Merck) có SPS (Sigma).
  + Vách ngăn pha đặc và pha lỏng.
- Chai cấy máu được bọc trong màng co, có ghi lô và ngày sản xuất. Khi chưa dùng, bảo quản trong tối, nhiệt độ phòng thí nghiệm và có hạn dùng 2 năm kể từ ngày sản xuất. Nếu bảo quản trong tủ lạnh, SPS sẽ bị kết tủa lại, nhưng kết tủa này sẽ tan sau khi ủ trong tủ ấm vài giờ.

### Cách cấy máu

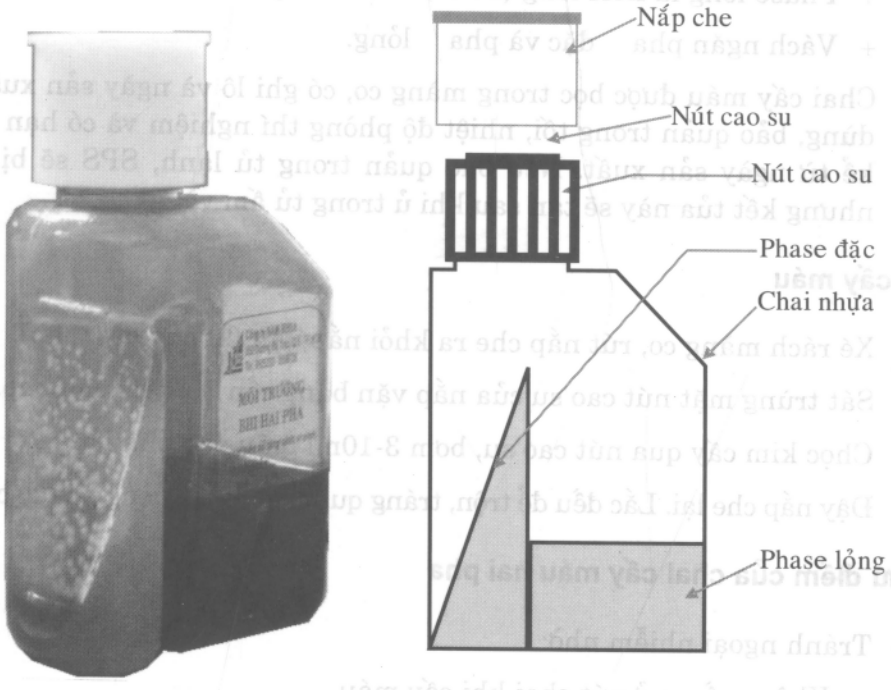
- Xé rách màng co, rút nắp che ra khỏi nắp vặn (không vặn nắp).
- Sát trùng mặt nút cao su của nắp vặn bằng cồn 70% rồi chờ khô.
- Chọc kim cấy qua nút cao su, bơm 3-10ml máu vào pha lỏng.
- Đậy nắp che lại. Lắc đều để trộn, tráng qua mặt môi trường pha đặc. Ủ 35-37°C.

### Các ưu điểm của chai cấy máu hai pha

- Tránh ngoại nhiễm nhờ:
  + Không cần mở nút chai khi cấy máu.
  + Cấy truyền ngay trong chai cấy máu kín từ pha lỏng qua pha đặc.
- Môi trường cấy máu lý tưởng vì:

+ Chế từ môi trường BHI của Difco, Biorad hay Merck.
+ Có SPS với các công dụng.

- Kháng đông, nhờ đó vi khuẩn không bị bẫy trong cục máu đông.
- Ức chế thực bào.
- Ức chế bổ thể.
- Ức chế tác động của các kháng sinh Aminoglycosides.
- Tách rời pha đặc khỏi pha lỏng để:
  + Nếu trong máu có chất ức chế vi khuẩn (kháng sinh), chất ức chế từ máu hoà vào pha lỏng sẽ sẽ không thấm qua pha đặc. Nhờ vậy vi khuẩn không mọc trong pha lỏng vẫn có thể mọc trong pha đặc.
  + Làm được kháng sinh đồ trực tiếp từ chai cấy máu dương tính.
- Tiết kiệm thời gian, có thể làm kháng sinh đồ trực tiếp từ chai cấy máu dương tính bằng cách dùng pha lỏng làm huyền dịch vi khuẩn trải lên mặt thạch Mueller Hinton để làm kháng sinh đồ, đọc kết quả sau 6-8 giờ ủ. 95% các trường hợp này có kết quả phù hợp với phương pháp chuẩn.




**Hình 1.1:** Cấu tạo chai cấy máu hai pha

## PHỤ LỤC 2:

## Một số điểm cần cân nhắc để lựa chọn chai cấy máu 2 pha hiện đang có mặt trên thị trường Việt Nam

### Chai cấy máu 2 pha sản xuất trong nước

- Công ty sản xuất đạt ISO 9001: 2000, WHO-GMP/GLP (UKASS)
- Kháng đông bằng SPS của Sigma (Mỹ).
- Môi trường BHI của Merck (Đức), hay Biorad (Mỹ).
- Thể tích môi trường 50ml tương thích để cấy máu cho cả người lớn (5ml máu) hay trẻ con (1-3ml).
- Chai bằng nhựa trong suốt, rất dễ phát hiện khóm vi khuẩn mọc
- Tách rời pha đặc ra khỏi pha lỏng nên khóm vi khuẩn sẽ dễ mọc và dễ tách rời.
- Dễ thao tác trong thí nghiệm vì nhẹ, miệng chai rộng dễ cho vòng cấy vào bên trong để lấy dịch cấy cũng như khóm vi khuẩn.
- Các vi khuẩn khó mọc như *H. influenzae* hay *S. pneumoniae* vẫn mọc được dễ dàng.

### Chai cấy máu 2 pha của Ấn Độ (Hi-Media)

- Không chắc kháng đông bằng SPS của Sigma (Mỹ).
- Môi trường BHI của HiMedia (Ấn Độ), kém xa về chất lượng so với BHI của Merck hay Biorad.
- Thể tích môi trường < 20ml chỉ tương thích để cấy máu cho trẻ con (1-2ml). Muốn dùng cấy máu cho người lớn thì phải dùng chai có thể tích môi trường 50ml với giá thành cao hơn.
- Chai bằng thuỷ tinh dày, khó phát hiện khóm vi khuẩn mọc trên pha đặc và pha lỏng.
- Không tách rời pha đặc ra khỏi pha lỏng nên khóm vi khuẩn sẽ rất khó mọc trên pha đặc và dễ bị bong khỏi pha đặc khi thao tác. Ngoài ra nếu bệnh nhân đã dùng kháng sinh thì kháng sinh sẽ thấm vào pha đặc và ức chế vi khuẩn mọc trên pha đặc.
- Rất khó thao tác trong thí nghiệm vì nặng, miệng chai hẹp khó cho vòng cấy vào bên trong để lấy dịch cấy cũng như khóm vi khuẩn.

– Thử nghiệm cho thấy vi khuẩn *H. influenzae* và *S. pneumoniae* rất khó mọc trong chai cấy máu này.

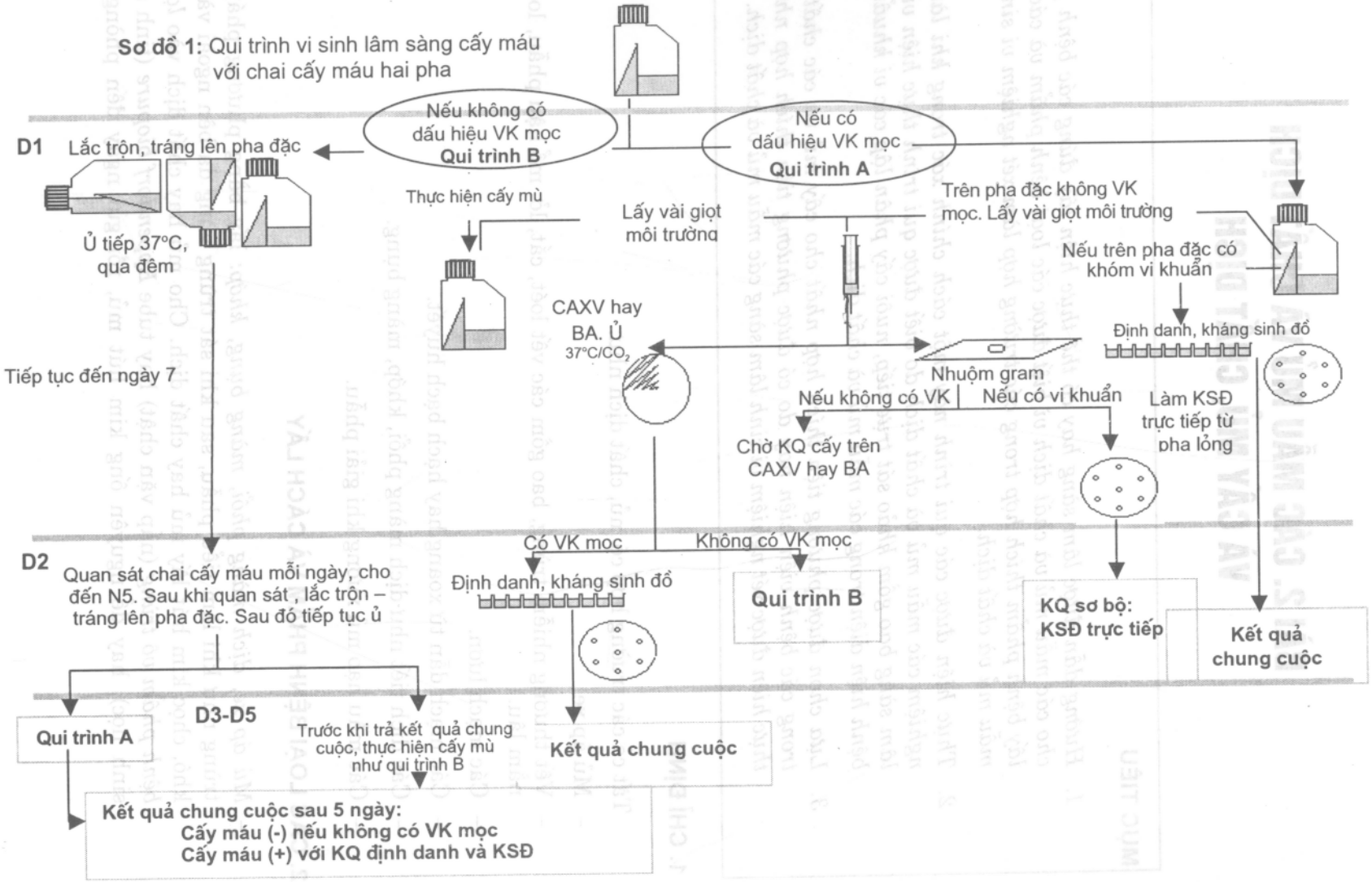



**Hình 1.2:** Chai cấy máu 2 pha có vi khuẩn mọc (trái) và chai cấy máu 2 pha chưa cấy bệnh phẩm (phải)




**Hình 1.3:** Chai cấy máu 2 pha nước ngoài dùng môi trường Hi - Media của Ấn Độ

**Sơ đồ 1:** Qui trình vi sinh lâm sàng cấy máu với chai cấy máu hai pha



# BÀI 2. CÁC MẪU MỦ VÀ CHẤT DỊCH VÀ CẤY MỦ, CHẤT DỊCH

**MỤC TIÊU**

1. *Hướng dẫn được lâm sàng hay có thể thực hiện lấy đúng các bệnh phẩm cho các mẫu mủ và chất dịch vì biết được các loại bệnh phẩm và các cách lấy bệnh phẩm thích hợp trong các trường hợp làm xét nghiệm vi sinh các mẫu mủ và chất dịch.*
2. *Thực hiện được các qui trình này một cách chính xác trong khi làm xét nghiệm các mẫu mủ và chất dịch do biết được qui trình thực hiện vi sinh lâm sàng bao gồm khảo sát trực tiếp, nuôi cấy phân lập các vi khuẩn gây bệnh hiện diện trong các mẫu mủ và chất dịch.*
3. *Lựa chọn được phương tiện thích hợp nhất cho cấy mủ và các chất dịch trong các bệnh viện hiện nay do có được phương tiện thích hợp nhất để thực hiện được xét nghiệm vi sinh lâm sàng các mẫu mủ và chất dịch.*

## 1. CHỈ ĐỊNH

Tất cả các trường hợp có mủ, chất dịch như:

- Mủ áp xe.
- Vết thương nhiễm trùng, bao gồm các vết loét, cắt, lở, mổ hậu phẫu, loét do nằm lâu.
- Các mạch lươn.
- Các mạch dẫn từ xoang hay hạch bạch huyết.
- Các dịch tiết như dịch màng phổi, khớp, màng bụng.
- Các mẫu nạo mủ xương khi giải phẫu.

## 2. CÁC LOẠI BỆNH PHẨM VÀ CÁCH LẤY

- *Mủ áp xe, dịch màng phổi, màng bụng, khớp:* lấy bằng phương pháp vô trùng như khi làm tiểu phẫu, sau khi sát trùng vùng da bên ngoài và chờ khô, chọc kim hút lấy mủ hay chất dịch. Cho mủ hay chất dịch vào *lọ lấy bệnh phẩm vô trùng* (nắp vặn chặt) hay tube *Eppendorf biopure* (tinh sạch sinh học), hay để nguyên ống kim hút mủ, rồi gửi ngay đến phòng thí

nghiệm để yêu cầu cấy ngay. Có thể tẩm mủ vào tăm bông rồi cho vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies (dùng *cặp tube đũa tăm bông vô trùng / tube đũa Stuart -Amies*), hay có thể cấy ngay tại giường bệnh với *chai 2 mặt thạch cấy các dịch không tạp nhiễm* (xem giới thiệu chai 2 mặt thạch cấy DNT và các dịch không tạp nhiễm) rồi chuyển về phòng thí nghiệm.

- *Các vết thương nhiễm trùng:* lau sạch vùng da lành chung quanh với cồn 70%. Lau sạch mủ trên vết thương bằng gạc vô trùng thấm nước muối sinh lý vô trùng. Dùng *tăm bông vô trùng lấy mẫu* để quệt lấy mủ, chất dập nát, hay mô (ngay dưới lớp mủ đã chùi sạch); hay lấy mẫu cho vào *lọ lấy bệnh phẩm vô trùng*, hay tube *Eppendorf biopure* rồi gửi ngay đến phòng thí nghiệm để yêu cầu cấy ngay. Nếu chưa có thể gửi ngay, cho tăm bông đã quệt mủ vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies (dùng *cặp tube đũa tăm bông vô trùng / tube đũa Stuart -Amies*).
- *Các nạo mủ hay mô khi giải phẫu:* cũng được lấy bằng quệt tăm bông hay trực tiếp cho mẫu vào *lọ lấy bệnh phẩm vô trùng*, hay tube *Eppendorf biopure* rồi gửi ngay đến phòng thí nghiệm. Nếu chưa có thể gửi ngay, cho vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies (dùng *cặp tube đũa tăm bông vô trùng / tube đũa Stuart -Amies*).
- *Các mạch lươn hay mạch dẫn:* dùng *tăm bông mảnh vô trùng* luồn vào mạch lươn; hay *pipet Pasteur nhựa* hút lấy mủ cho vào *lọ lấy bệnh phẩm vô trùng*, hay tube *Eppendorf biopure* rồi gửi ngay đến phòng thí nghiệm. Nếu chưa có thể gửi ngay, cho vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies (dùng *cặp tube đũa tăm bông vô trùng / tube đũa Stuart -Amies*).

## 3. KHẢO SÁT ĐẠI THỂ

- Màu: đỏ, vàng, xanh...
- Mùi: thối, tanh, hăng...
- Tính chất: đặc, lỏng, nhầy, có máu...

## 4. KHẢO SÁT VI THỂ

Nhộm gram. Nếu kết quả nhuộm gram thấy có vi khuẩn thuần khiết, có thể làm kháng sinh đồ trực tiếp mẫu bệnh phẩm. Nhuộm kháng acid (nếu có yêu cầu).

## 5. NUÔI CẤY

- Cấy ngay vào các hộp thạch phân lập:
- Tối thiểu là BA hay BA có nalidixic acid (BANg) và MC hay EMB.
- Nếu có điều kiện, cấy thêm MSA hay DNA agar, BA có gentamicin.
- Nếu nghi nấm, cấy thêm thạch Sabouraud.

- Các hộp BA phải được ủ 35-37°C trong tủ ấm $CO_2$ hay bình nến. Các trường hợp khác, ủ khí trường bình thường.
- Quan sát hộp thạch liên tục trong 3 ngày, một khi có khóm vi khuẩn mọc, tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ ngay.
- Cấy dự phòng vào một ống Thioglycollat hay BHI, ủ đồng thời với các hộp thạch phân lập. Nếu trên hộp thạch phân lập không có vi khuẩn mọc mà ống BHI hay Thioglycollat đục thì cấy phân lập từ các ống môi trường này.

## 6. CÁC VI KHUẨN GÂY BỆNH CÓ THỂ PHÂN LẬP ĐƯỢC

- Thường gặp
  + *Streptococcus pyogenes,*
  + *Staphylococcus aureus,*
- Ít gặp hơn
  + Các trực khuẩn *Enterobacteriaceae,*
  + *Pseudomonas* và các trực khuẩn gram (-) không lên men,
  + *Streptococci* (các loài khác),
  + *Clostridium perfringens,*
  + *Bacteroides* và các vi khuẩn kỵ khí khác.
- Rất hiếm gặp
  + *Bacillus anthracis,*
  + *M. tuberculosis,*
  + *M. ulcerans,*
  + *Pasteurella multocida.*

## 7. CẤY MỦ, CHẤT DỊCH – CÁC CÂU HỎI THƯỜNG GẶP

### 7.1. Tại sao có nhiều trường hợp cấy mủ do nhiễm trùng vết thương hở cho kết quả không phù hợp với hiệu quả điều trị kháng sinh trong lâm sàng?

- Thực tế đúng như vậy, lý do là khi lấy mủ làm xét nghiệm, thường chúng ta hay lấy mủ trên bề mặt vết thương nhiễm trùng và như vậy có khi vi khuẩn phân lập được không phải chính là vi khuẩn gây bệnh mà chỉ là các vi khuẩn tạm trú trong mủ, do mủ cũng là môi trường tốt cho nhiều loại vi khuẩn tăng trưởng.

- Chính vì vậy, lấy mủ để tìm vi khuẩn gây bệnh trong các trường hợp vết thương hở, cần phải lau sạch mủ và chỉ quệt lấy chất dịch trên bề mặt lớp mô của vết thương, đây mới chính là bệnh phẩm có nhiều khả năng chứa vi khuẩn gây nhiễm trùng vết thương.

### 7.2. Tại sao có trường hợp cấy mủ hay chất dịch kết quả âm tính, thậm chí có khi khảo sát trực tiếp qua phết nhuộm gram vẫn thấy có hiện diện vi khuẩn?

- Cấy mủ kết quả âm tính có thể là do: (1) Kháng sinh đã làm sạch được vi khuẩn và mủ chỉ chứa xác vi khuẩn, xác bạch cầu; (2) Mủ gửi đến phòng thí nghiệm không được cấy ngay, đặc biệt các trường hợp mủ được lấy trực tiếp mà không cho vào môi trường chuyên chở; (3) Vi khuẩn có quá ít trong mẫu mủ (như mủ kết mạc hay giác mạc mắt), trong trường hợp này có thể làm tăng sinh mủ trong BHI khoảng 2-3 giờ rồi mới cấy.
- Ngoài ra, cấy mủ có thể âm tính trong các trường hợp nhiễm trùng kỵ khí mà trong khi đó chúng ta chỉ cấy mủ theo qui trình hiếu khí. Các mẫu mủ chúng ta có thể nghi ngờ có nhiễm trùng kỵ khí là các mẫu có mùi thối, có gas (có bọt khí), mủ áp xe... (xem thêm ở phần qui trình cấy kỵ khí).

### 7.3. Khi nào có thể làm kháng sinh đồ trực tiếp mẫu mủ?

- Đa số các mẫu mủ đều có thể làm kháng sinh đồ trực tiếp, nhưng tốt nhất là các mẫu mủ không bị tạp nhiễm (như mủ áp xe). Có thể quan sát qua một phết nhuộm gram để có thể biết được mẫu không bị tạp nhiễm nhờ chỉ thấy một hình thái vi khuẩn thuần khiết.
- Tuy làm kháng sinh đồ trực tiếp nhưng cũng không thể bỏ qua khâu định danh và kháng sinh đồ bằng qui trình thường qui vì qui trình này mới có thể cho được kết quả chính xác và đầy đủ.

### 7.4. Hãy cho biết phương tiện thích hợp nhất để lấy, chuyên chở các quệt mủ, các chất dịch và các mủ abcess?

- Không nên dùng các phương tiện tự chế trong bệnh viện như: các que tăm bông tự quấn cho vào ống nghiệm nhét gòn rồi hấp hay sấy khử trùng; hay các lọ kiểu chai peni hay tube thuỷ tinh nhét gòn rồi hấp sấy vô trùng để lấy các bệnh phẩm mủ và các chất dịch. Lý do là các phương tiện này rất khó thao tác khi lấy bệnh phẩm trên bệnh nhân, hay khi lấy bệnh phẩm để làm xét nghiệm trong phòng thí nghiệm. Ngoài ra các phương tiện này cũng không an toàn khi thao tác hay chuyên chở vì nguy cơ rỉ bệnh phẩm lên miệng tube hay chai. Nguy cơ ngoại nhiễm bệnh phẩm cũng rất cao khi dùng các phương tiện này.
- Sau đây là các phương tiện thích hợp nhất để lấy và chuyên chở các bệnh phẩm mủ và chất dịch:




**Hình 2.1:** Tube đũa tăm bông vô trùng được thiết kế rất thuận lợi để lấy các quệt bệnh phẩm




**Hình 2.2:** (A) Cặp tube đũa tăm bông vô trùng/môi trường chuyên chở Stuart – Amies; (B) Cặp tube đũa tăm bông mảnh vô trùng/môi trường chuyên chở Stuart-Amies

(1) Tăm bông vô trùng lấy mẫu được thiết kế với phần nắp tube gắn sẵn tăm bông do vậy khi rút nắp tube ra khỏi ống, tăm bông sẽ được rút ra theo và tay người thao tác cũng sẽ không chạm vào miệng tube, sau khi lấy quệt mủ xong tăm bông có thể được cho vào lại trong tube hay cho vào tube đũa chứa môi trường chuyên chở Stuart -Amies đi kèm.

(2) Cặp tube đũa tăm bông vô trùng/tube đũa môi trường chuyên chở Stuart - Amies được thiết kế để tăm bông của tube đũa tăm bông vô trùng sau khi lấy mẫu xong cho vừa vặn vào tube đũa môi trường chuyên chở Stuart -Amies với thao tác rất dễ dàng và thuận tiện.

(3) Lọ vô trùng lấy mẫu rất thích hợp để lấy các chất dịch hay mủ abcess nhờ nắp vặn khi mở ra tay người thao tác sẽ không chạm miệng lọ (tay chạm miệng lọ sẽ rất dễ có nguy cơ ngoại nhiễm), sau khi lấy bệnh phẩm xong vặn chặt nắp, lọ sẽ rất kín không bị rò rỉ khi chuyên chở mẫu.

(4) Tăm bông mảnh vô trùng lấy mẫu rất thích hợp để lấy các quệt mủ từ các ống hẹp như mạch lươn, ống catheter... và cũng tương thích để có thể cho vào tube đũa môi trường chuyên chở Stuart – Amies.

## 8. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết các chỉ định lâm sàng để cấy mủ và các chất dịch.

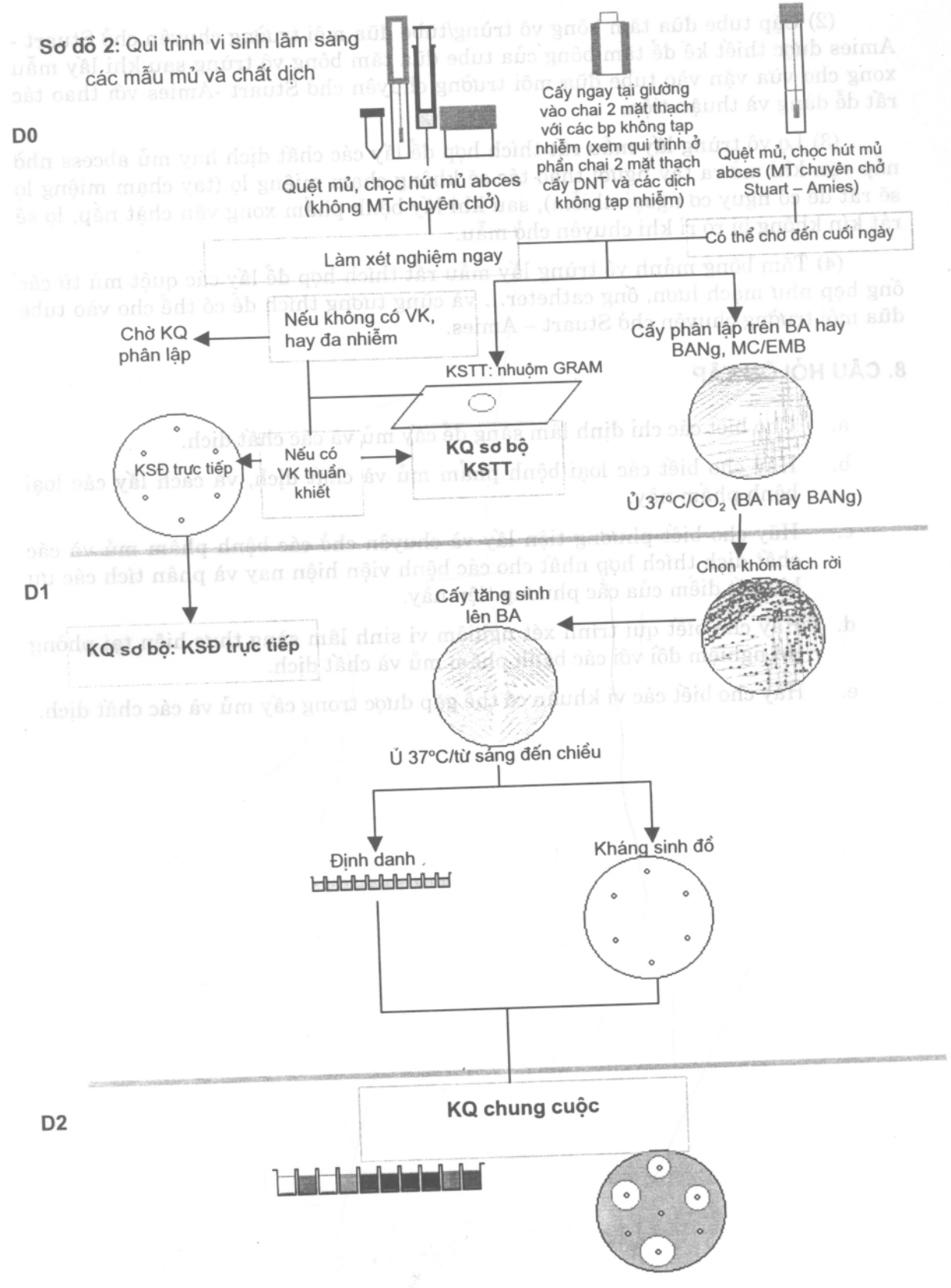
b. Hãy cho biết các loại bệnh phẩm mủ và chất dịch, và cách lấy các loại bệnh phẩm này.

c. Hãy cho biết phương tiện lấy và chuyên chở các bệnh phẩm mủ và các chất dịch thích hợp nhất cho các bệnh viện hiện nay và phân tích các ưu khuyết điểm của các phương tiện này.

d. Hãy cho biết qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng thực hiện tại phòng thí nghiệm đối với các bệnh phẩm mủ và chất dịch.

e. Hãy cho biết các vi khuẩn có thể gặp được trong cấy mủ và các chất dịch.

**Sơ đồ 2:** Qui trình vi sinh lâm sàng các mẫu mủ và chất dịch



# BÀI 3. MẪU PHÂN VÀ CẤY PHÂN

**MỤC TIÊU**

1. *Hướng dẫn được lâm sàng hay thực hiện hay lấy đúng mẫu phân làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng phát hiện các tác nhân vi khuẩn gây bệnh nhờ biết được các cách lấy và chuyên chở mẫu phân.*
2. *Thực hiện được các qui trình vi sinh lâm sàng mẫu phân một cách chính xác và thích hợp nhờ biết được qui trình thực hiện.*
3. *Lựa chọn được phương tiện thích hợp nhất cho cấy phân trong các bệnh viện hiện nay nhờ biết được phương tiện thích hợp nhất để thực hiện được xét nghiệm vi sinh lâm sàng mẫu phân.*

## 1. CHỈ ĐỊNH CẤY PHÂN

- Chỉ định cấy phân khi bệnh nhân bị tiêu chảy hay bị các rối loạn tiêu hoá ***nghi do bị nhiễm trùng tiêu hóa***.
- Đứng trước các bệnh nhân có một trong các triệu chứng sau đây, nên cho chỉ định cấy phân: ***tiêu chảy, lỵ với phân có mủ, nhầy hay máu, bị cơn đau bụng***.

## 2. THỜI ĐIỂM LẤY PHÂN

- Nên lấy vào giai đoạn sớm, càng sớm càng tốt của bệnh.
- Lấy phân khảo sát trước khi bệnh nhân dùng kháng sinh.

## 3. CÁCH LẤY MẪU PHÂN

- Có thể lấy phân tươi, tốt nhất là vùng nhầy máu, cho vào lọ sạch; rộng miệng; nắp vặn chặt có gắn mái chèo (dùng *lọ lấy mẫu phân không $F_2M$*), gửi đến phòng thí nghiệm. Phân tươi phải được cấy trong vòng không quá 2 giờ sau khi lấy mẫu.
- Có thể dùng tăm bông nhúng vào phân, vùng nhầy máu, cho vào môi trường chuyên chở Cary -Blair (dùng cặp *tube đũa tăm bông vô trùng/tube đũa Cary -Blair*) rồi gửi đến phòng thí nghiệm. Môi trường chuyên chở Cary - Blair có thể giữ mẫu phân trong hơn 48 giờ. Tuy nhiên, phải tiến hành cấy càng sớm càng tốt. Trong trường hợp nghi bệnh nhân bị thổ tả (do vi khuẩn tả), có thể cho tăm bông lấy phân vào ống môi trường pepton kiềm để vừa tăng sinh, vừa chuyên chở đến phòng thí nghiệm.

- Có thể lấy mẫu phân bằng tăm bông quệt hậu môn rồi cho vào môi trường chuyên chở (dùng cặp *tube đũa tăm bông vô trùng/tube đũa Cary -Blair*) để gửi ngay đến phòng thí nghiệm.
- Có thể không dùng môi trường chuyên chở nếu tăm bông lấy phân (dùng *tăm bông vô trùng lấy mẫu*) được nuôi cấy trong vòng 30 phút sau khi lấy mẫu.

## 4. KHẢO SÁT ĐẠI THỂ

Quan sát mẫu phân và ghi nhận:

- Lỏng hay đặc? Có nhầy, có máu không?
- Màu: trắng, vàng, nâu đen? Có giun sán không?

## 5. KHẢO SÁT VI THỂ

Chỉ khảo sát vi thể các trường hợp sau:

- Làm phết soi tươi trong trường hợp nghi tả.
- Làm phết nhuộm gram trong trường hợp nghi tả và nghi *Campylobacter jejuni*.

## 6. NUÔI CẤY

- Có thể cấy phong phú vào các môi trường
  + GN broth để phong phú cả *Salmonella* lẫn *Shigella*.
  + Pepton kiềm để phong phú Vibrio.
  + Campy-thio để phong phú *C. jejuni*.
- Cấy ngay phân, hay cấy từ môi trường phong phú đã cấy phân vào các hộp thạch phân lập:
  + Tối thiểu là MC (hay EMB) và SS (hay XLD hay HE).
  + Nếu có yêu cầu tìm *Vibrio*, cấy thêm lên MEA hay TCBS.
  + Nếu có yêu cầu tìm *C. jejuni* thì cấy thêm Campy -CAP.
  + Nếu nghi nấm, cấy thêm thạch Sabouraud.
- Các hộp thạch phân lập phải được ủ 35-37°C trong tủ ấm. Riêng hộp Campy-CAP thì ủ vi hiếu khí trong nhiệt độ 42°C.
- Quan sát hộp thạch sau khi ủ qua đêm, chọn khóm vi khuẩn nghi ngờ để tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ.
- Đối với các khóm vi khuẩn nghi ngờ *Salmonella* hay *Shigella* thì có thể làm phản ứng tụ với kháng huyết thanh đặc hiệu để định nhóm hay định type.

## 7. CÁC VI KHUẨN LÀ TÁC NHÂN GÂY BỆNH TÌM THẤY TRONG MẪU PHÂN

- Các vi khuẩn chắc chắn gây bệnh: *Salmonella, Shigella*, các *E. coli* gây bệnh (ETEC, EPEC, EIEC, VETEC), *S. aureus* (có enterotoxin), *V. cholerae* và các *Vibrio* khác, *Campylobacter jejuni* và các *Campylobacter* khác, *Yersinia enterocolitica* và các *Yersinia* khác, *Clostridium difficile* (có toxin).
- Các vi khuẩn có thể gây bệnh: *Plesiomonas, Aeromonas.*
- Các vi khuẩn khác có thể gây bệnh nếu chiếm đa số do bị loạn khuẩn.

## 8. CẤY PHÂN – CÁC CÂU HỎI THƯỜNG GẶP

### 8.1. Phương tiện nào thích hợp để lấy và chuyên chở mẫu phân?

- Nếu lấy mẫu phân tươi thì tốt nhất là dùng lọ sạch có mái chèo gắn trên nắp để lấy mẫu. Cũng có thể dùng tăm bông vô trùng để quệt lấy mẫu phân. Mẫu phân tươi phải được gửi đến phòng thí nghiệm để làm xét nghiệm ngay vì nếu chậm trễ thì sẽ làm giảm cơ hội phát hiện các vi khuẩn gây bệnh.
- Trong điều kiện hiện nay, tốt nhất là dùng cặp tube đũa tăm bông vô trùng/ tube đũa Cary -Blair để lấy mẫu phân. Lý do là với phương tiện này, phòng thí nghiệm có thể để dồn mẫu lại để cấy vào cuối ngày hay vào thời điểm thích hợp nhất trong ngày mà không cần phải cấy ngay mỗi khi nhận được mẫu.
- Tránh dùng các lọ penicillin rửa sạch, tube nắp gòn với tăm bông tự quấn hay các lọ nhựa, hũ thuỷ tinh để lấy mẫu phân vì như vậy sẽ không an toàn trong khâu gửi mẫu hay trong thao tác xét nghiệm.

### 8.2. Tại sao đa số các trường hợp tiêu chảy xét nghiệm phân thường âm tính?

- Có thể bệnh bị tiêu chảy không phải do vi khuẩn mà do các nguyên nhân khác như do virus, do thẩm thấu, do đau bao tử, hay do các rối loạn tiêu hoá khác. Một tác nhân virus thường gây tiêu chảy là Rota virus và phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng có thể phát hiện tác nhân này nếu có phương tiện sinh học phân tử (PCR, hay chỉ cần ly trích ARN toàn phần rồi điện di để phát hiện 11 vạch ARN đặc hiệu của virus) hay miễn dịch (tụ latex hay điện di miễn dịch đối lưu để phát hiện kháng nguyên đặc hiệu của virus trong phân).
- Có thể bệnh nhân bị tiêu chảy do các tác nhân vi khuẩn ngoài khả năng phát hiện của phòng thí nghiệm do thiếu phương tiện, hay do phòng thí nghiệm không có kinh nghiệm để phát hiện như *E. coli* (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, VETEC), *S. aureus* tiết enterotoxin, mà muốn phát hiện

chính xác phải có thêm phương tiện miễn dịch hay sinh học phân tử; hay *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficille*, *Y. enterocolitica*, mà muốn phát hiện phải có phương tiện nuôi cấy thích hợp; *Vibrio cholerae*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* mà muốn phát hiện thì phải có kinh nghiệm hay phải có quan tâm trước.

- Cũng có thể do không dùng đúng phương tiện để lấy và chuyên chở bệnh phẩm, kéo theo hậu quả là vi khuẩn gây bệnh không còn nhiều trong bệnh phẩm, hay do phòng thí nghiệm chậm trễ làm xét nghiệm các mẫu phân tươi không được lấy vào môi trường chuyên chở. Ngoài ra một nguyên do nữa có thể là do phòng thí nghiệm không có phương tiện vi sinh tối thiểu để phân lập vi khuẩn gây bệnh trong mẫu phân cũng như định danh được vi khuẩn gây bệnh có trong mẫu phân.
- Cuối cùng, có thể do bệnh nhân đã dùng kháng sinh trước khi lấy mẫu nên không thể cấy được vi khuẩn gây bệnh có trong phân.

**8.3. Với qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng mẫu phân như đã trình bày, có phải chúng ta chỉ phát hiện được một số chứ không phải tất cả các vi khuẩn gây bệnh?**

- Qui trình đã trình bày cho phép chúng ta có thể phát hiện hầu hết các vi khuẩn gây bệnh kể cả *C. jejuni* và *Vibrio spp*. Chỉ có *C. difficille, S. aureus* sinh Enterotoxin và *Y. enterocolitica* là không thể phát hiện được vì cần phải có thêm phương tiện nuôi cấy thích hợp, tuy nhiên đây là 2 tác nhân không thường gặp.
- Với *C. jejuni*, vì đây là vi khuẩn cũng khá thường gặp, do vậy các bệnh viện cũng nên quan tâm để trang bị cho phòng thí nghiệm phương tiện nuôi cấy phát hiện được tác nhân này (xem phần kỹ thuật phân lập *C. jejuni*).
- Với các vi khuẩn *E. coli* gây bệnh, để phát hiện được EPEC, phòng thí nghiệm phải trang bị thêm bộ kháng huyết thanh phát hiện (có thể mua từ Biorad). Với các *E. coli* khác như ETEC, EIEC, EHEC, VETEC thì nếu muốn phát hiện chính xác cần phải có thêm các phương tiện miễn dịch hay sinh học phân tử (PCR).
- Với *S. aureus* sinh enterotoxin, để phát hiện chính xác thì cần phải có thêm bộ thuốc thử ELISA phát hiện độc tố hay phương tiện sinh học phân tử phát hiện enterotoxin gen bằng kỹ thuật PCR.
- Với các phòng thí nghiệm không thể trang bị thêm các phương tiện phát hiện chính xác *E. coli*, nếu không phát hiện được các tác nhân vi khuẩn gây bệnh khác mà trên hộp thạch phân lập vi khuẩn *E. coli* lại chiếm đa số thì nên làm kháng sinh đồ vi khuẩn này để trả lời kết quả cho lâm sàng.
- Các vi khuẩn không gây bệnh đường ruột như *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*... có thể là tác nhân gây tiêu chảy trong các trường hợp loạn khuẩn do vậy vẫn nên làm kháng sinh đồ và trả lời kết quả cho lâm sàng nếu chiếm đa số trên hộp thạch phân lập và không có các vi khuẩn gây bệnh khác.

## 9. CÂU HỎI ÔN TẬP

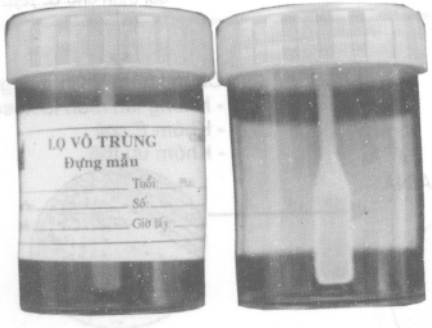
a. Cho biết các chỉ định để cấy phân.

b. Hãy cho biết cách lấy mẫu phân như thế nào?

c. Hãy cho biết phương tiện để lấy và chuyên chở mẫu phân thích hợp nhất cho các bệnh viện hiện nay, và phân tích các ưu khuyết điểm của các phương tiện này.

d. Hãy cho biết qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng thực hiện tại phòng thí nghiệm đối với bệnh phẩm phân.

e. Hãy cho biết các vi khuẩn gây bệnh có thể gặp được trong cấy phân.




**Hình 3.1:** Lọ lấy phân tươi có trang bị mái chèo gắn trên nắp rất thuận tiện cho bệnh nhân lấy phân và nắp vặn chặt tránh nguy cơ rỉ phân ra miệng lọ

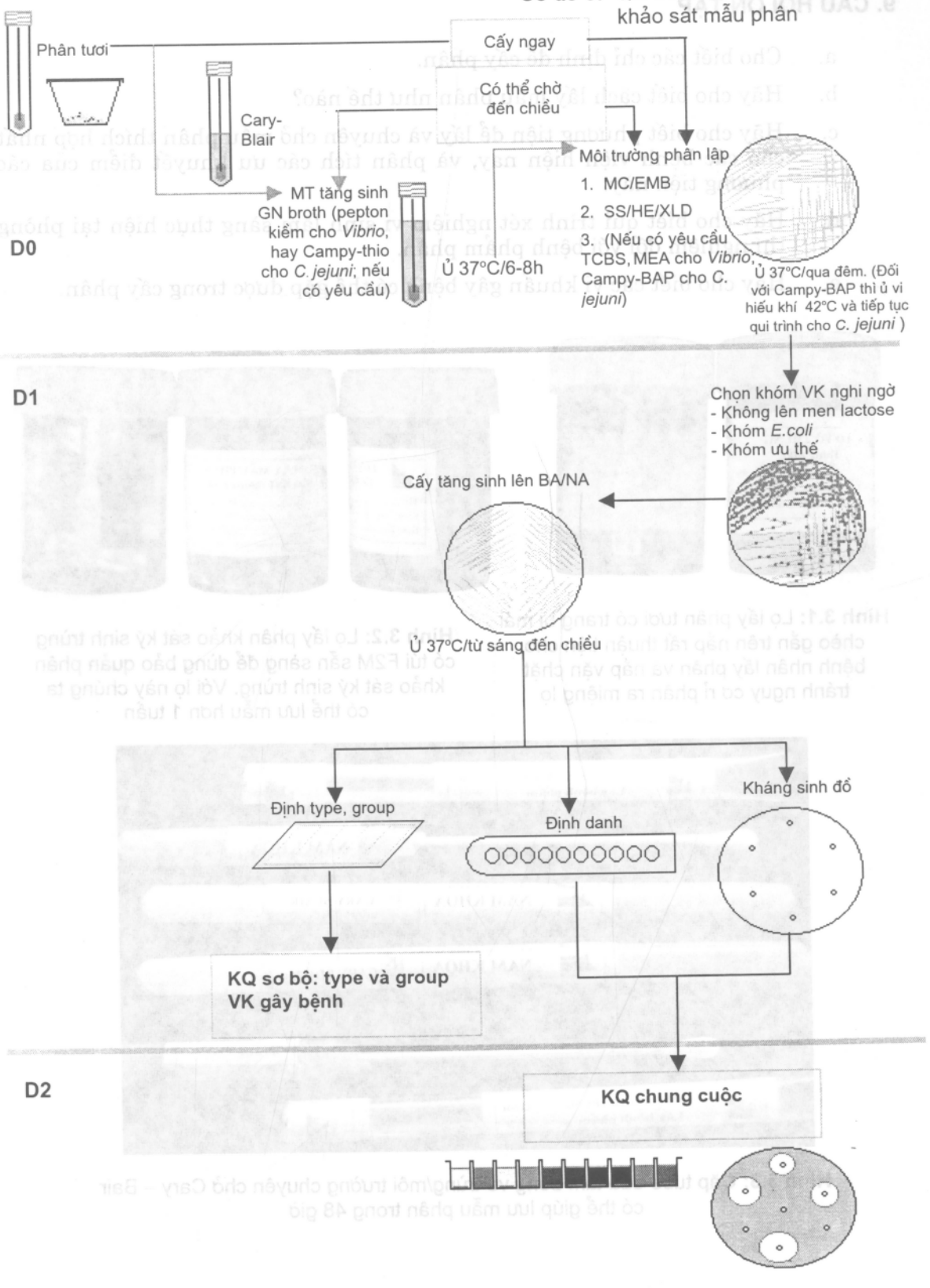



**Hình 3.2:** Lọ lấy phân khảo sát ký sinh trùng có túi F2M sẵn sàng để dùng bảo quản phân khảo sát ký sinh trùng. Với lọ này chúng ta có thể lưu mẫu hơn 1 tuần




**Hình 3.3:** Cặp tube đũa tăm bông vô trùng/môi trường chuyên chở Cary – Bair có thể giúp lưu mẫu phân trong 48 giờ

**Sơ đồ 3:** Qui trình vi sinh lâm sàng khảo sát mẫu phân



# PHỤ LỤC 1:

## Kỹ thuật phân lập *Campylobacter jejuni*

### Lấy mẫu

Mẫu có thể lấy tươi gửi đến phòng thí nghiệm để làm xét nghiệm ngay. Nếu để chậm trễ hơn 2 giờ thì mẫu phải lấy vào môi trường chuyên chở/tăng sinh Campy -thio.

### Phân lập Campylobacter jejuni

Có thể cấy phân lập ngay, hay có thể giữ tăng sinh mẫu trong Campy - thio ở tủ ấm 42°C trong 4 – 6 giờ rồi mới cấy phân lập. Có hai cách:

- Phân lập trực tiếp: cấy bệnh phẩm bằng phương pháp 3 chiều trên môi trường Campy – BAP, rồi ủ hộp thạch trong một bình ủ kỵ khí (Genbox-anaer của bio -Mérieux) dùng bao sinh vi hiếu khí (Microanaer của bio - Mérieux). Giữ bình trong tủ ấm 42°C trong 24 đến 48 giờ.
- Phân lập qua lọc: dùng một lọc cellulose acetat 0,65µm vô trùng đặt trên mặt hộp thạch Campy – BAP nhưng không có kháng sinh. Dùng pipet Pasteur vô trùng hút bệnh phẩm hay dung dịch tăng sinh bệnh phẩm, nhỏ 5 – 15 giọt lên tâm của giấy lọc. Ủ ngửa hộp thạch trong tủ ấm 37°C hay 42°C trong 1 giờ. Sau đó lấy tờ giấy lọc ra khỏi mặt thạch, tránh không cho bệnh phẩm nhỏ trực tiếp lên mặt thạch. Ủ hộp thạch này trong điều kiện vi hiếu khí như trên.

### Định danh *Campylobacter jejuni*

- Sau khi ủ, quan sát mặt thạch. *C. jejuni* cho khuẩn lạc khá tiêu biểu: màu xám nhạt hay xám vàng nhạt, hơi nhầy, đôi khi có đuôi theo đường cấy (*hình 10*). Kích thước khá lớn: 1,5 – 2 mm.
- Nhuộm gram, vi khuẩn ăn màu gram [-], hơi nhỏ, hình cong, có thể thấy dạng đặc trưng hình cánh chim hải âu. Đôi khi có hình dấu ngã (*hình 3.1*).
- Soi tươi qua kính hiển vi đảo pha hay nền đen, thấy vi khuẩn di động như tên bắn.
- Thử nghiệm oxidase [+], catalase [+]

Hội đủ được các yếu tố trên là có thể định danh *Campylobacter jejuni.*

# PHỤ LỤC 2:

## Môi trường cần thiết để phân lập *C. jejuni*

### Dung dịch kháng sinh 100x

- Công thức

| | |
|---|---|
| Vancomycin | 100mg |
| Trimethoprim | 50mg |
| Polymyxin B | 25000UI |
| Amphotericin B | 20mg |
| Cephalothin | 150mg |
| Nước cất | 100ml |

- Vô trùng qua lọc milipore. Phân phối vào các chai, mỗi chai 2ml để chế 200 ml môi trường. Giữ các chai trong tủ đông –70°C

### Môi trường chuyên chở/tăng sinh Campy -thio

- Công thức

| | |
|---|---|
| Thioglycolat media | 30gr |
| Bacto agar | 1,6gr |
| Nước cất | 1000ml |

- Đun tan môi trường và agar, để nguội, chỉnh pH đến 7,2.
- Phân vào các chai Duran loại 250ml nắp vặn chặt, mỗi chai cho vào chính xác 200ml môi trường. Hấp khử trùng 121°C/15 phút. Để nguội, thêm vào mỗi chai 2ml dung dịch kháng sinh 100X ở trên. Có thể để nguyên chai trong tủ lạnh 4°C, hay phân phối vô trùng 5ml Campy -thio vào các tube 15 x 125mm vô trùng nắp vặn chặt rồi giữ trong tủ lạnh 4°C (không quá 2 tháng).

### Môi trường phân lập Campy -BAP

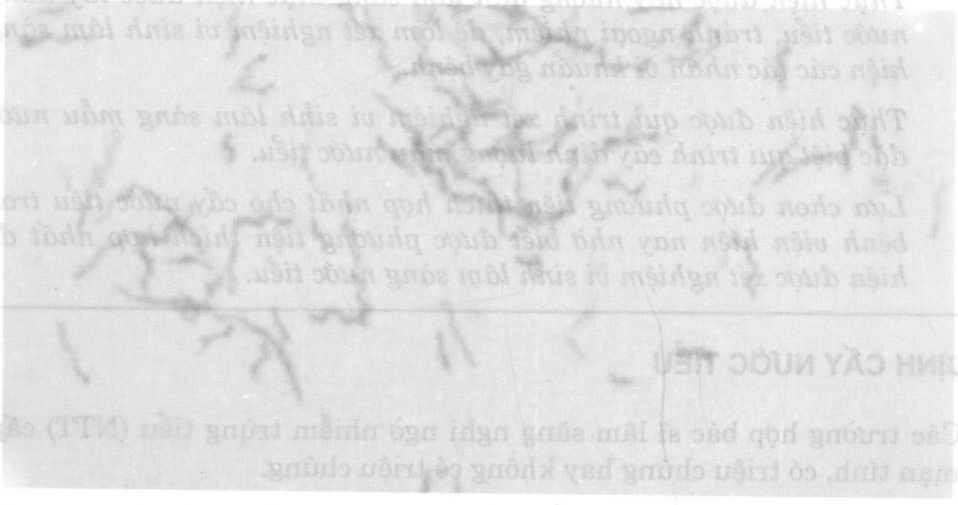
- Công thức

| | |
|---|---|
| Brucella agar base | 43gr |
| Nước cất | 1000ml |

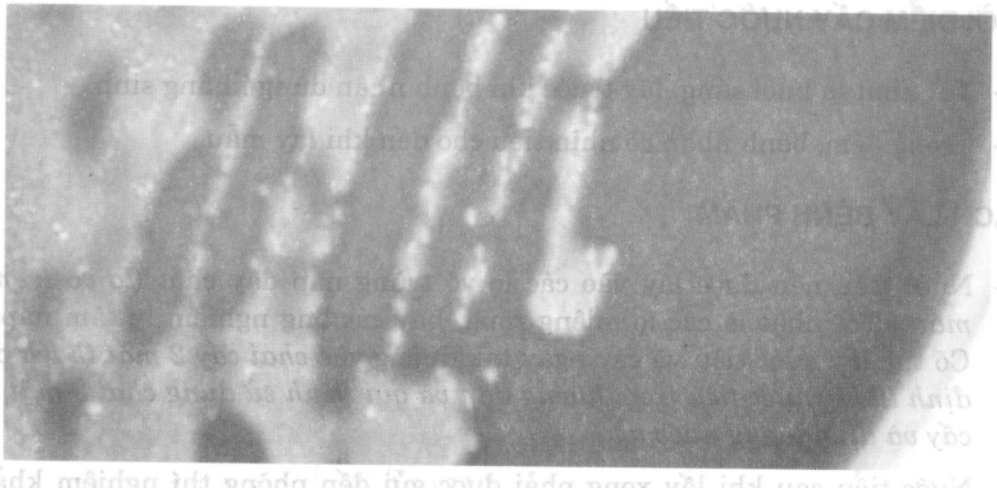
- Đun tan môi trường và agar, để nguội, chỉnh pH đến 7,2.

- Phân vào các chai Duran 250ml nắp vặn chặt, mỗi chai 200ml môi trường. Khử trùng bằng hấp ướt 121°C/15 phút. Để nguội đến 45°C, thêm vào mỗi chai 10ml máu cừu đã mất fibrin và 2ml dung dịch kháng sinh 100X ở trên. Lắc nhẹ để trộn đều, tránh bọt. Đổ vào hộp petri vô trùng loại 90 mm, mỗi hộp đổ 18 – 20 ml môi trường. Chờ đặc lại hoàn toàn.

Giữ các hộp thạch trong tủ lạnh (không quá 2 tháng).



**Hình 3.1:** Hình ảnh Gram vi khuẩn *Campylobacter jejuni*



**Hình 3.2:** Hình ảnh khóm vi khuẩn *Campylobacter jejuni* trên thạch Campy - BAP

# BÀI 4. MẪU NƯỚC TIỂU VÀ CẤY NƯỚC TIỂU

**MỤC TIÊU**

1. *Thực hiện được hay hướng dẫn lâm sàng thực hiện được lấy đúng mẫu nước tiểu, tránh ngoại nhiễm, để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng phát hiện các tác nhân vi khuẩn gây bệnh.*
2. *Thực hiện được qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng mẫu nước tiểu, đặc biệt qui trình cấy định lượng mẫu nước tiểu.*
3. *Lựa chọn được phương tiện thích hợp nhất cho cấy nước tiểu trong các bệnh viện hiện nay nhờ biết được phương tiện thích hợp nhất để thực hiện được xét nghiệm vi sinh lâm sàng nước tiểu.*

## 1. CHỈ ĐỊNH CẤY NƯỚC TIỂU

- Các trường hợp bác sĩ lâm sàng nghi ngờ nhiễm trùng tiểu (NTT) cấp tính, mạn tính, có triệu chứng hay không có triệu chứng.
- Nên cho chỉ định cấy nước tiểu đối với các bệnh nhân có một trong các triệu chứng nghi ngờ bệnh nhân bị (1) nhiễm trùng bàng quang ***như đái ra mủ, đái khó, đái ra máu, đái đau, đau tức vùng trên xương mu hay bụng dưới***, hay (2) nhiễm trùng thận ***như đau lưng, tức căng vùng góc sống - sườn***.

## 2. THỜI ĐIỂM CẤY NƯỚC TIỂU

- Tốt nhất là buổi sáng, lấy trước khi bệnh nhân dùng kháng sinh.
- Trong đêm, bệnh nhân cố nhịn tiểu cho đến khi lấy mẫu.

## 3. CÁCH LẤY BỆNH PHẨM

- Nước tiểu nên được lấy vào các lọ vô trùng nắp đậy chặt (*lọ vô trùng lấy mẫu*). Tốt nhất là các lọ miệng rộng, hay các ống nghiệm ly tâm nắp chặt. Có thể lấy nước tiểu và cấy ngay tại giường vào *chai cấy 2 mặt thạch cấy và định lượng nước tiểu* (*xem hướng dẫn và qui trình sử dụng chai 2 mặt thạch cấy và định lượng nước tiểu*).
- Nước tiểu sau khi lấy xong phải được gửi đến phòng thí nghiệm khảo sát ngay. Nếu chậm trễ, có thể giữ trong tủ lạnh 4°C, nhưng không quá 4 giờ.

- Nước tiểu phải được lấy bằng phương pháp vô trùng, tránh tối đa sự nhiễm bẩn từ cơ quan sinh dục ngoài. Sau đây các phương pháp lấy nước tiểu từ bệnh nhân.

### 3.1. Đối với phụ nữ hay trẻ gái lớn, bệnh nhân tự làm hay điều dưỡng giúp

- Rửa tay kỹ bằng xà phòng, nước rồi lau khô bằng khăn sạch.
- Cởi quần, vạch âm môi, rửa sạch rồi thấm xà phòng trong ra ngoài bằng bông hay gạc vô trùng.
- Rửa sạch xà phòng rồi thấm khô bằng gạc vô trùng. Suốt quá trình vẫn dùng tay vạch âm môi không cho đụng vào phần bên trong.
- Tiểu bỏ phần đầu, lấy nước tiểu phần còn lại.

### 3.2. Đối với đàn ông hay trẻ trai lớn, bệnh nhân tự làm hay điều dưỡng giúp

- Rửa tay sạch như trên.
- Kéo phần da qui đầu tụt ra sau.
- Rửa sạch cũng như trên.
- Tiểu bỏ phần đầu, lấy phần nước tiểu còn lại.

### 3.3. Đối với trẻ nhỏ, khó lấy hơn vì bệnh nhân không biết hợp tác

- Trước khi lấy nước tiểu nên cho bệnh nhân uống nhiều nước.
- Cho bệnh nhân ngồi trên đùi mẹ, rửa sạch bộ phận sinh dục ngoài rồi xi bé tiểu, hứng lấy nước tiểu càng nhiều càng tốt.

### 3.4. Có thể lấy bằng các phương pháp khác

- Chọc qua da trên xương mu.
- Bằng ống thông tiểu hay qua nội soi bàng quang.

## 4. KHẢO SÁT TRỰC TIẾP

Trộn đều nước tiểu rồi nhỏ 1 giọt trực tiếp trên lam. Chờ khô tự nhiên rồi nhuộm gram. Quan sát dưới vật kính dầu.

- Nếu có ít nhất 1 tế bào vi khuẩn và/hay bạch cầu hiện diện trên một quang trường, có thể nghi ngờ bệnh nhân bị nhiễm trùng tiểu. Có thể làm kháng sinh đồ trực tiếp từ mẫu nước tiểu này.
- Nếu toàn phết nhuộm không hay phát hiện được rất ít tế bào vi khuẩn hay bạch cầu, bệnh nhân chắc chắn không bị nhiễm trùng tiểu.

## 5. CẤY NƯỚC TIỂU

- Dùng vòng cấy định lượng 0,01 (10µl) hay 0,001 (1µl), lấy đầy một vòng cấy, cũng có thể dùng micropipet với đầu tip vô trùng lấy 1µl nước tiểu, trải toàn bộ lên bề mặt hộp thạch nuôi cấy (thường là BA hay BANg và MC hay EMB).
- Ủ BA hay BANg trong bình nến, MC hay EMB ủ thường, tất cả trong tủ ấm 35-37°C, để qua đêm.
- Đọc kết quả bằng cách đếm số khóm trùng để biết số lượng vi khuẩn trong mầm cấy ban đầu, sau đó suy ra toàn bộ số lượng vi khuẩn sống (Colony Forming Unit=CFU) trong 1 ml nước tiểu. Nếu có:
  + ≤ 10000 CFU/ml nước tiểu, không có nhiễm trùng tiểu.
  + ≥ 100000 CFU/ml nước tiểu, chắc chắn có nhiễm trùng tiểu, định danh vi khuẩn và làm kháng sinh đồ.
  + 10000 ≤ 100000 CFU/ml nước tiểu, nghi ngờ nhiễm trùng tiểu. Trong trường hợp này, nếu bệnh nhân có dấu hiệu lâm sàng chắc chắn nhiễm trùng tiểu hay bị nhiễm trùng tiểu tái phát nhiều lần, có thể định danh vi khuẩn phân lập được và làm kháng sinh đồ.

## 6. KHẢO SÁT SINH HÓA, TẾ BÀO VÀ CẶN LẮNG

- Thực hiện sau khi cấy.
- Đối với sinh hóa, dùng giấy nhúng.
- Quay ly tâm lấy cặn để khảo sát tế bào và cặn lắng.

## 7. CÁC VI KHUẨN THƯỜNG LÀ TÁC NHÂN GÂY NHIỄM TRÙNG TIỂU

- *Enterobacteriaceae (Escherichia coli, Klebsiella spp, Proteus spp...)*
- *Enterococcus spp.*
- *Pseudomonas aeruginosa*, và các trực khuẩn không lên men khác.
- *Staphylococcus aureus.*
- *S. epidermidis.*
- *S. saprophyticus.*
- *Candida albicans.*
- *M. tuberculosis.*

## 8. CẤY NƯỚC TIỂU – CÁC CÂU HỎI THƯỜNG GẶP

### 8.1. Làm thế nào để lấy đúng nước tiểu làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng?

- Lấy đúng nước tiểu để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng là phải lấy nước tiểu giữa dòng, lấy bằng phương pháp vô trùng, trong đó quan trọng nhất là phải rửa sạch bộ phận sinh dục ngoài trước khi hứng lấy nước tiểu giữa dòng.
- Dụng cụ đựng nước tiểu để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng cũng phải thích hợp, nghĩa là phải dùng các lọ vô trùng và có thể hứng lấy nước tiểu dễ dàng cũng như không chảy thấm ra ngoài trong quá trình chuyên chở đến phòng thí nghiệm. Thích hợp nhất là các lọ dung tích khoảng 50-100ml, vô trùng, miệng rộng, có nắp vặn chặt và có nhãn để ghi tên bệnh nhân cũng như các thông tin tối thiểu khác về bệnh phẩm.
- Trên thực tế rất ít khi lâm sàng quan tâm sử dụng đúng dụng cụ lấy nước tiểu, rất nhiều nơi chỉ dùng các lọ thuỷ tinh kiểu chai đựng thuốc chích rửa sạch, nhét gòn hay các tube thuỷ tinh nhét gòn rồi sấy hay hấp để vô trùng. Các vật liệu như vậy không chỉ rất khó hứng nước tiểu giữa dòng mà còn bị thấm ra miệng lọ hay tube gây nguy cơ ngoại nhiễm cho mẫu và còn có thể nguy hiểm cho người xét nghiệm.
- Ngoài ra cũng có nhiều nơi lâm sàng không quan tâm hướng dẫn hay giúp bệnh nhân lấy đúng nước tiểu giữa dòng và lấy vô trùng, thậm chí có khi bệnh nhân lại lấy nước tiểu trong bô để đưa cho lâm sàng. Chính vì vậy mẫu nước tiểu gửi đến phòng thí nghiệm có thể bị ngoại nhiễm và gây sai lệch kết quả.

### 8.2. Quay ly tâm nước tiểu và làm phết nhuộm gram cặn lắng có giá trị gì không?

- Hiện nay vẫn có một số phòng thí nghiệm làm phết nhuộm gram cặn lắng nước tiểu sau ly tâm và trả lời cho lâm sàng các hình ảnh gram vi khuẩn họ quan sát được. Thật sự kết quả này không có ý nghĩa gì trong việc cho biết bệnh nhân có hay không có bị nhiễm trùng tiểu và bị nhiễm trùng do vi khuẩn gram nào vì đa số các cặn lắng nước tiểu dù không bị nhiễm trùng tiểu vẫn có chứa một ít vi khuẩn do kết quả của sự tạp nhiễm khi nước tiểu đi qua đường sinh dục ngoài.
- Tuy nhiên nhuộm gram cặn lắng nước tiểu sau ly tâm lại rất có giá trị để phát hiện vi khuẩn lậu (*N. gonorrhoeae*) là các song cầu gram [-] hình hạt cà phê nội tế bào trong các tế bào niêm mạc đường tiểu hay đường sinh dục.

### 8.3. Nếu chưa thể cấy ngay, có thể lưu mẫu nước tiểu trong tủ lạnh 4°C được không? Và lưu được trong bao lâu?

- Tốt nhất là nước tiểu phải được chuyển đến phòng thí nghiệm ngay sau khi lấy và phải được cấy ngay vì nếu để chậm trễ các vi khuẩn tạp nhiễm sẽ tăng sinh trong nước tiểu và làm sai lệch kết quả cấy định lượng. Chính vì vậy, trong các phiên trực, hay khi không có kỹ thuật viên cấy định lượng nước tiểu, tốt nhất phòng thí nghiệm dùng chai cấy nước tiểu hai mặt thạch vì với phương tiện này bất cứ ai cũng thực hiện được kỹ thuật cấy định lượng nước tiểu.
- Có thể giữ nước tiểu trong tủ lạnh 4°C, nhưng không được quá 4 giờ. Tuy nhiên có nhiều mẫu nước tiểu bị đục do sự hình thành các tinh thể khi để lạnh, do vậy các mẫu này không thể khảo sát cặn lắng được.

### 8.4. Phát hiện nitrit trong nước tiểu có chính xác không để xác định nhiễm trùng tiểu?

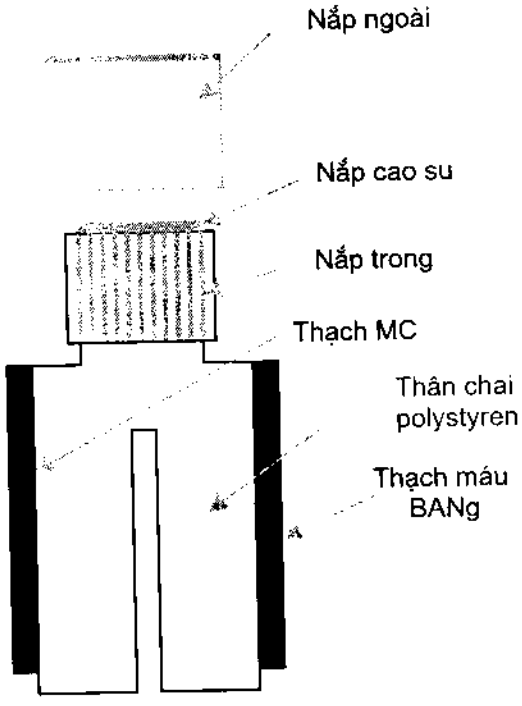
- Phát hiện nitrit để xác định nhiễm trùng tiểu dựa trên nguyên tắc là nếu có nhiễm trùng tiểu, vi khuẩn trong nước tiểu sẽ khử được nitrat trong nước tiểu thành nitrit. Tuy nhiên không phải tất cả các vi khuẩn đều có khả năng này, do vậy vẫn có nhiều trường hợp nhiễm trùng tiểu nhưng khi thử nitrit vẫn âm tính.
- Ngoài phương pháp tìm nitrit, cũng có thể tìm sự hiện diện của bạch cầu trong nước tiểu để xác định nhiễm trùng tiểu vì một khi có nhiễm trùng tiểu thì có phản ứng viêm và có phản ứng viêm là có hiện diện bạch cầu. Người ta phát hiện bạch cầu bằng cách phát hiện men myeloperoxidase hay một số men đặc hiệu của bạch cầu có trong nước tiểu khi có bạch cầu.
- Cả hai phương pháp trên vẫn là các phương pháp gián tiếp phát hiện nhiễm trùng tiểu, không thể cho biết vi khuẩn gây bệnh là vi khuẩn gì và cũng không thể cho biết kháng sinh đồ. Chính vì vậy, phương pháp vi sinh cấy định lượng phát hiện nhiễm trùng tiểu là phương pháp chuẩn nhất và hữu dụng cho lâm sàng nhất.

# PHỤ LỤC

## Sản phẩm liên quan: Chai cấy định lượng nước tiểu hai mặt thạch BANg và MC

### Mục đích sử dụng

Chai cấy hai mặt thạch BANg và MC đã được nghiên cứu sản xuất ra để thực hiện được kỹ thuật cấy định lượng nước tiểu một các dễ dàng thay phương pháp cấy định lượng kinh điển phải dùng micropipett vô trùng 1µl hay phải dùng vòng cấy định lượng.




**Hình 4.1:** Cấu tạo chai cấy nước tiểu 2 mặt thạch BANg và MC

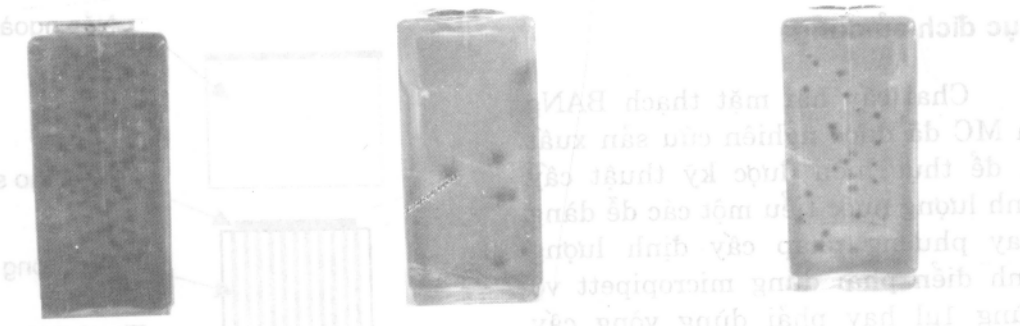
### Đóng gói

Chai cấy hai mặt thạch BANg - MC là chai bằng polystyren có đổ hai mặt thạch BANg và MC trên hai mặt hông của chai. Chai có nắp vặn chặt với mặt nắp bằng cao su dễ dàng đâm kim bơm mầm cấy vào. Chai còn có một nắp ngoài bọc bảo vệ lớp nắp trong. Tất cả được bọc kín bằng màng co.

### Cách sử dụng

- Xé rách màng co, rút nắp ngoài khỏi nắp trong, vặn nắp trong để mở chai.
- Đổ nước tiểu cần cấy vào chai, đậy chặt nắp trong. Lắc nhẹ để tráng đều nước tiểu lên hai mặt thạch. Mở nắp trong để đổ bỏ tất cả nước tiểu trong chai ra ngoài. Vặn nắp trong trở lại nhưng giữ nắp lỏng. Đậy nắp ngoài lên. ủ chai ở vị trí thẳng trong bình nến rồi để trong tủ ấm 35-37°C. Quan sát khóm vi khuẩn mọc trên hai mặt thạch mỗi ngày trong 2 ngày. Đọc kết quả định lượng như hình dưới.
- Kết quả định danh sơ bộ có thể đọc như sau:
- Nếu chỉ có vi khuẩn mọc trên mặt thạch BANg mà không mọc được trên mặt thạch MC thì vi khuẩn phân lập được có thể là cầu khuẩn gram [+] như *ntreptococcus faecalis* hay *Staphylococcus aureus* hay *S. saprophyticus.*

- Nếu vi khuẩn mọc trên MC mà không mọc trên BANg thì đó là các trực khuẩn gram [-] dễ mọc.
- Tất cả vi khuẩn phân lập được đều phải nhuộm gram, định danh và làm kháng sinh đồ.

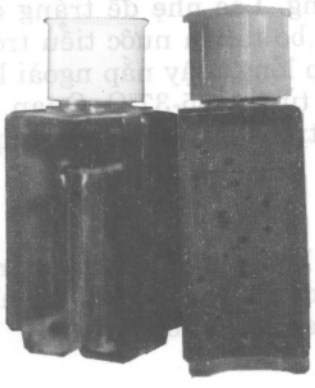


Mẫu dương tính (nhiễm trùng tiểu) | Mẫu âm tính (không nhiễm trùng tiểu) | Mẫu nghi ngờ (có thể nhiễm trùng tiểu)

**Hình 4.2:** Đánh giá các mức độ vi khuẩn mọc trên chai cấy nước tiểu hai mặt thạch BANg và MC




**Hình 4.3:** Lọ nắp đỏ vô trùng lấy nước tiểu giúp bệnh nhân dễ dàng lấy nước tiểu và tránh nguy cơ nước tiểu bị rỉ ra ngoài trong quá trình chuyên chở đến phòng thí nghiệm hay khi thao tác với bệnh phẩm



**Hình 4.4:** Chai 2 mặt thạch BANg và MC dùng cấy định lượng nước tiểu, rất thích hợp trong các phiên trực khi phòng thí nghiệm không có nhân viên trực chuyên khoa vi sinh

## 9. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết các chỉ định để cấy nước tiểu.

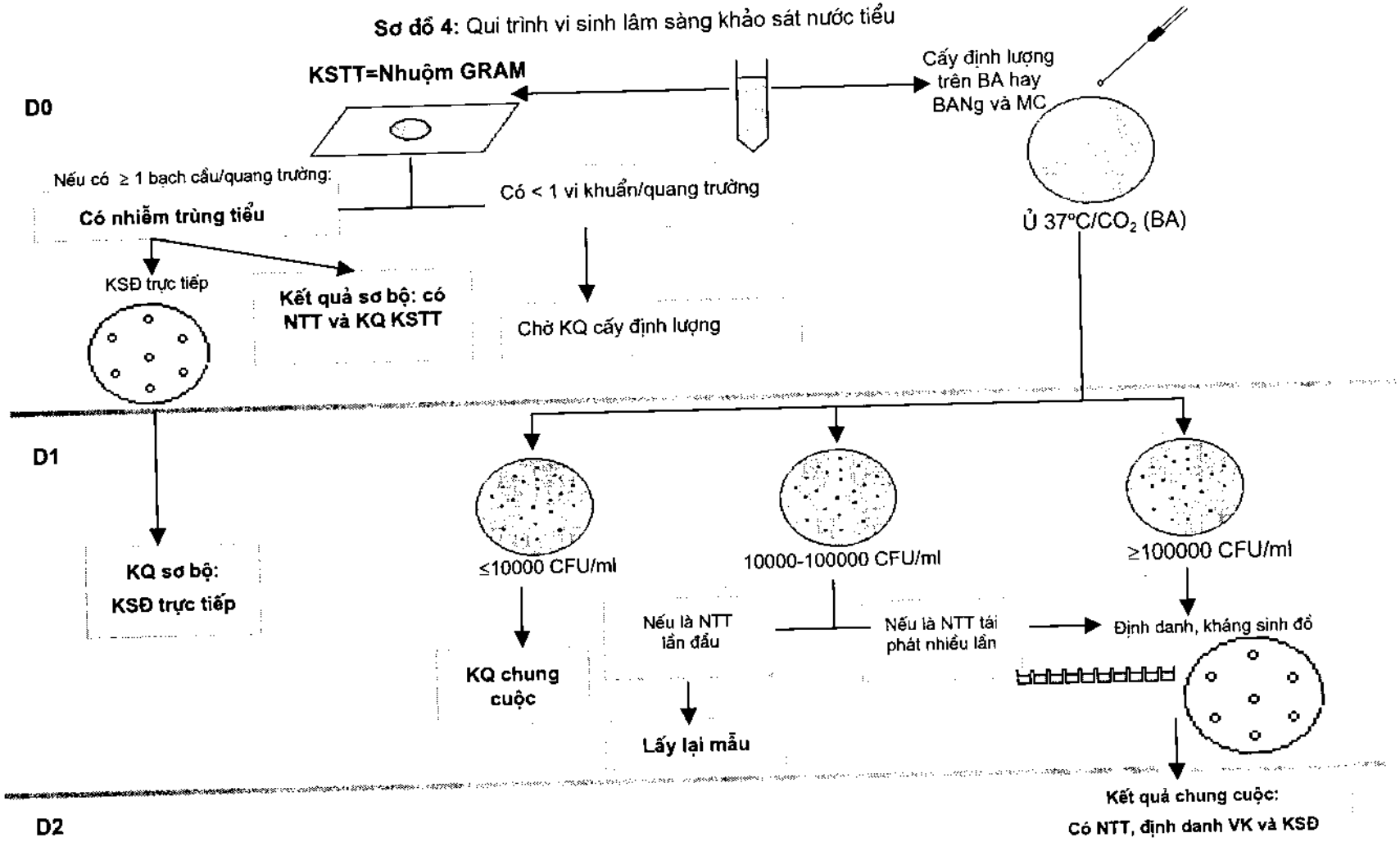
b. Hãy cho biết các cách lấy mẫu nước tiểu như thế nào?

c. Hãy cho biết phương tiện lấy và chuyên chở mẫu nước tiểu thích hợp nhất cho các bệnh viện hiện nay và phân tích các ưu khuyết điểm của các phương tiện này.

d. Hãy cho biết qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng thực hiện tại phòng thí nghiệm đối với bệnh phẩm nước tiểu.

e. Hãy cho biết các vi khuẩn gây bệnh có thể gặp được trong cấy nước tiểu.

**Sơ đồ 4:** Qui trình vi sinh lâm sàng khảo sát nước tiểu



# BÀI 5. DỊCH NÃO TỦY

**MỤC TIÊU**

1. *Lấy, chuyên chở dịch não tuỷ và thấy được tính cấp thiết phải gửi gấp dịch não tuỷ đến phòng thí nghiệm để cấy ngay để tăng cơ hội bắt được vi khuẩn gây bệnh.*
2. *Thực hiện được đầy đủ các bước để không bỏ sót các cơ hội phát hiện các tác nhân vi khuẩn gây bệnh nhờ biết được qui trình thực hiện vi sinh lâm sàng mẫu dịch não tuỷ.*
3. *Phát hiện được các tác nhân thường gây viêm màng não mủ dù các tác nhân này đa số rất là khó mọc vì biết dùng các phương tiện cần thiết và thích hợp nhất để thực hiện được xét nghiệm vi sinh lâm sàng dịch não tuỷ.*

## 1. CHỈ ĐỊNH CHỌC DÒ DỊCH NÃO TỦY (DNT) KHẢO SÁT VI SINH LÂM SÀNG

- DNT nên được chọc dò để khảo sát vi sinh lâm sàng trước các bệnh nhân có các triệu chứng ***nghi ngờ viêm màng não***.
- Không nên chọc dò DNT trước các bệnh nhân có dấu hiệu gia tăng áp lực nội sọ. Dấu hiệu này được khám phá qua soi đáy mắt thấy gai thị bị phù nề.

## 2. THỜI ĐIỂM CHỌC DÒ DNT

- Càng sớm càng tốt, ngay sau khi có chẩn đoán lâm sàng.
- Trước khi bệnh nhân dùng kháng sinh điều trị hệ thống.

## 3. CÁCH LẤY VÀ CHUYÊN CHỞ

- DNT phải được bác sĩ chuyên khoa chọc dò, phương pháp vô trùng.
- 5-10ml DNT được lấy vào 2 lọ vô trùng nắp chặt (có thể dùng tube nắp vàng vô trùng hay tube *Eppendorf biopure*) rồi gửi ngay đến phòng thí nghiệm, không chậm trễ. Một lọ khảo sát vi khuẩn học và một lọ khảo sát sinh hóa tế bào.
- Có thể cấy ngay tại giường với *chai 2 mặt thạch cấy DNT và các dịch không tạp nhiễm (xem hướng dẫn và qui trình sử dụng chai 2 mặt thạch cấy DNT và các dịch không tạp nhiễm)*.

## 4. QUAN SÁT ĐẠI THỂ

Ghi nhận các tính chất đại thể của DNT, như là:

- Trong, keo
- Đục, mủ
- Vàng, hay vàng chanh
- Có máu, có sợi fibrin, có cặn

## 5. KHẢO SÁT VI KHUẨN HỌC

Khảo sát vi khuẩn học theo các bước sau

### 5.1. Sửa soạn bệnh phẩm

- Nếu DNT đục, không cần ly tâm.
- Các trường hợp khác, ly tâm DNT 10 đến 15 phút ở tốc độ cao nhất của máy ly tâm bàn. Lấy phần cặn khảo sát vi thể và nuôi cấy, phần nước làm phản ứng hóa miễn dịch phát hiện kháng nguyên hòa tan và làm phản ứng sinh hóa.

### 5.2. Khảo sát vi thể

- Làm phết soi tươi

Nhỏ một giọt cặn ly tâm vào lam kính, đậy lamel lên. Đọc dưới quang trường x400, đóng bớt hay hạ bớt tụ quang để thấy rõ độ tương phản. Tìm:

+ Bạch cầu (đa nhân hay lympho), hồng cầu
+ Vi khuẩn, nấm men
+ Đơn bào (*Naegleria fowleri*)

Nếu có nấm men nghi *Cryptococcus neoformans*, quan sát dịch não tủy dưới giọt **mực tàu** hay với **nigrosin** 20%

- Làm phết nhuộm
  + Gram
  + Kháng acid (nếu có yêu cầu)

Kết quả phết nhuộm và kết quả soi tươi phải thông báo ngay cho bác sĩ điều trị.

### 5.3. Cấy phân lập vi khuẩn gây bệnh

- Vì là mẫu bệnh phẩm không bị ngoại nhiễm nên có thể cấy nhiều mầm cấy.

- Có thể chỉ cần cấy vào thạch nâu có bổ sung XV (CAXV), ủ ở nhiệt độ 35-37°C trong bình nến.
- Nếu không có điều kiện mà DNT là của trẻ con, có thể cấy vào hộp BA có vạch một vạch *S. aureus* thẳng góc với đường cấy mầm cấy để kích thích *H. influenzae* mọc được, ủ ở nhiệt độ 35-37°C trong bình nến.
- Phần DNT còn lại có thể cấy lưu dự phòng (back-up) vào dung dịch BHI.
- Theo dõi liên tiếp trong tối đa 3 ngày, bất cứ lúc nào có sự hiện diện của khóm vi khuẩn, tiến hành định danh và kháng sinh đồ. Nếu có điều kiện, định type hay group huyết thanh của vi khuẩn.
- Vì viêm màng não mủ (VMNM) là một bệnh nguy hiểm, đe dọa tính mạng, nên một khi có vi khuẩn mọc thì phải tiến hành nhuộm gram khóm vi khuẩn và kết hợp với tính chất khóm vi khuẩn mọc trên môi trường phân lập, phải trả lời kết quả tạm thời cho bác sĩ lâm sàng ngay.
- Nếu có yêu cầu tìm *C. neoformans*, cấy DNT trên thạch Sabouraud, trên BHI, ủ ở nhiệt độ 35-37°C. Cũng theo dõi liên tục trong 3 ngày.
- Nếu có yêu cầu tìm *M. tuberculosis*, cấy DNT vào môi trường Lowenstein - Jensen (nên cấy 3 ống), ủ ở nhiệt độ 35-37°C. Theo dõi liên tục trong 2 tháng.

## 6. TÌM KHÁNG NGUYÊN HÒA TAN CÁC VI KHUẨN GÂY BỆNH THƯỜNG GẶP TRONG DNT BẰNG CÁC PHƯƠNG PHÁP HÓA MIỄN DỊCH

Có thể phát hiện kháng nguyên hòa tan các vi khuẩn gây bệnh có trong DNT bằng một trong các phản ứng hóa miễn dịch như:

- Tụ latex với bộ thuốc thử MENINGITEX, PASTOREX..
- Điện di miễn dịch đối lưu (CCIE)
- ELISA

Trong các phương pháp trên thì phương pháp tụ latex cho kết quả nhanh nhất (không quá 3 phút), đơn giản nhất (có thể thực hiện ngay tại giường bệnh), ít chịu ảnh hưởng của các thông số kỹ thuật và rất nhạy cảm.

## 7. TÁC NHÂN VI KHUẨN GÂY VIÊM MÀNG NÃO

- Trẻ sơ sinh (cho đến 2 tháng tuổi)
  + *Escherichia coli,*
  + Các *Enterobacteriaceae* khác (*Salmonella spp, Citrobacter spp),*
  + *Streptococcus agalactiae* (nhóm B),
  + *Listeria monocytogenes,*
- Các lứa tuổi khác

+ *Haemophilus influenzae type B*[a],
+ *Neisseria meningitidis,*
+ *Streptococcus pneumoniae,*
+ *Mycobacterium tuberculosis,*
+ *Listeria monocytogenes*[b],
+ *Cryptococcus neoformans*[b],
+ *Staphylococci*[c].

**Bảng 5.1:** Biện luận kết quả sinh hóa -tế bào -vi thể - đại thể dịch não tuỷ để từ đó có thể suy đoán ra được tác nhân vi sinh vật gây viêm màng não mỷ

| Thông số | VMN vi khuẩn | VMN lao | VMN vi nấm | VMN virus |
|---|---|---|---|---|
| Bạch cầu | Đa nhân | Đơn nhân | Đơn nhân | Đơn nhân |
| Glucose | Rất thấp 5-20mg/100ml | Thấp 20-40mg/100ml | Thấp 20-40mg/100ml | Bình thường 65-70mg/100ml |
| Protein | Tăng | Tăng | Tăng | Hơi tăng trong giai đoạn đầu |
| Vi thể | Thường phát hiện được vi khuẩn | Hiếm khi thấy được AFB | Thường phát hiện được vi nấm | âm tính |
| Đại thể | Đục | Vàng chanh | Đục nhẹ | Trong |

[a] Là tác nhân gây VMNM thường gặp nhất ở tuổi từ 6 tháng đến 2 tuổi. Hiếm ở tuổi trên 5 tuổi.

[b] Gặp ở người bị suy giảm miễn dịch (ví dụ AIDS)

[c] Gặp ở người chịu phẫu thuật sọ não hay sau dẫn lưu

## 8. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết các chỉ định lâm sàng để cấy dịch não tủy, và thời điểm tốt nhất để lấy dịch não tủy.

b. Hãy cho biết các cách lấy và chuyên chở dịch não tuỷ đến phòng thí nghiệm để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

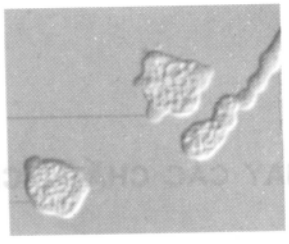
c. Hãy cho biết phương tiện lấy và chuyên chở dịch não tuỷ thích hợp nhất cho các bệnh viện hiện nay, và phân tích các ưu khuyết điểm của các phương tiện này.

d. Hãy cho biết qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng thực hiện tại phòng thí nghiệm đối với bệnh phẩm dịch não tủy.

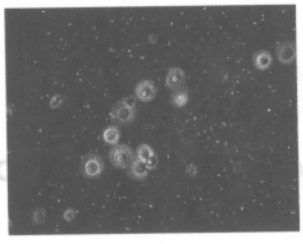
e. Hãy cho biết các vi khuẩn gây bệnh có thể gặp được trong cấy dịch não tủy.

f. Hãy cho biết các phương pháp hoá miễn dịch phát hiện kháng nguyên hòa tan các vi khuẩn gây bệnh viêm màng não mủ có trong dịch não tuỷ. Phân tích các ưu khuyết điểm của các phương pháp này.

g. Biện luận kết quả sinh hóa tế bào xét nghiệm dịch não tủy.



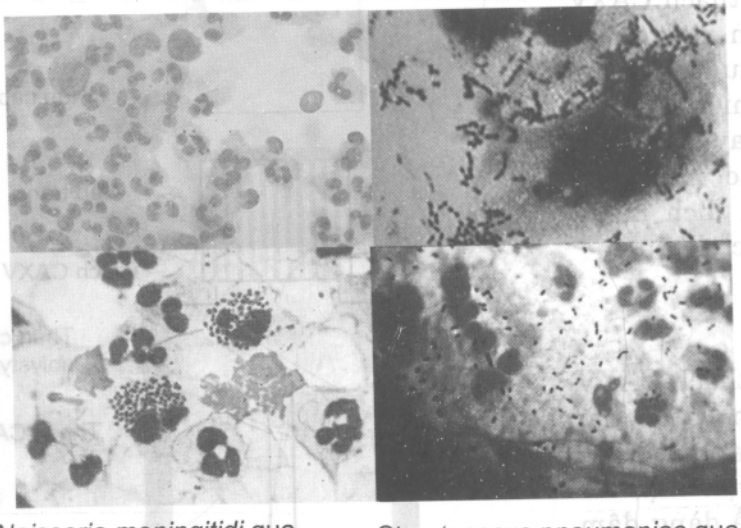
*Naegleria fowleri* soi tươi dưới KHV



*C.neoformans* soi dưới KHV đảo pha



*C.neoformans* soi tươi dưới KHV



*Neisseria meningitidi* qua phết gram dịch não tuỷ

*Streptococus pneumoniae* qua phết gram dịch não tuỷ

**Hình 5.1:** một số hình ảnh quan sát trực tiếp phết soi tươi hay phết nhuộm gram các mẫu dịch não tuỷ bệnh nhân VMNM

# PHỤ LỤC 1:

## Sản phẩm liên quan:

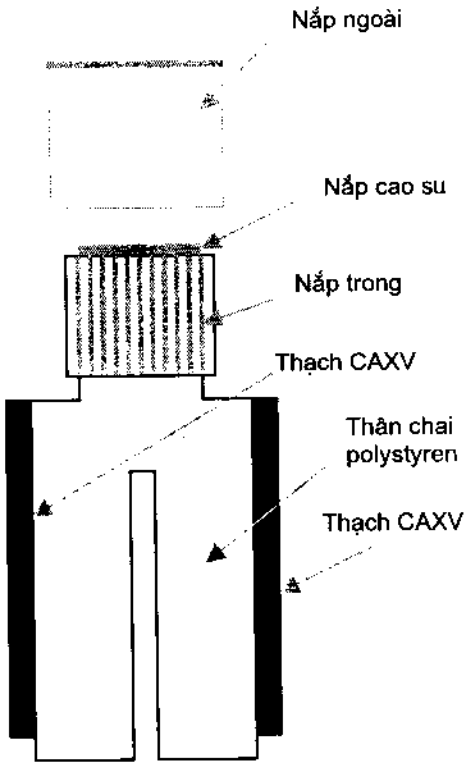
### CHAI HAI MẶT THẠCH CAXV ĐỂ CẤY DỊCH NÃO TUỶ HAY CÁC CHẤT DỊCH KHÔNG TẠP NHIỄM KHÁC

#### Mục đích sử dụng

Chai cấy hai mặt thạch CAXV đã được nghiên cứu sản xuất ra để thực hiện được kỹ thuật cấy tại giường hay cấy trong phiên trực các mẫu dịch não tuỷ; hay các dịch không tạp nhiễm khác như dịch màng phổi, mủ abcess, dịch màng bụng, dịch màng tim, dịch khớp...

#### Đóng gói

Chai cấy hai mặt thạch CAXV là chai bằng polystyren có đổ hai mặt thạch CAXV trên hai mặt hông của chai. Chai có nắp vặn chặt với mặt nắp bằng cao su dễ dàng đâm kim bơm mầm cấy vào. Chai còn có một nắp ngoài bọc bảo vệ lớp nắp trong. Tất cả được bọc kín bằng màng co.




**Hình 5.2:** Cấu trúc của chai 2 mặt thạch CAXV dùng cấy dịch não tuỷ và các dịch không tạp nhiễm khác

#### Cách sử dụng

- Xé rách màng co, rút nắp ngoài khỏi nắp trong.
- Mở nắp trong để cho bệnh phẩm tráng lên hai mặt thạch, sau đó vặn chặt lại nắp trong. Có thể không mở nắp trong mà dùng bơm tiêm hút lấy bệnh phẩm rồi bơm bệnh phẩm qua nắp cao su (sau khi sát trùng bằng cồn và để khô) để tráng lên hai mặt thạch. Để chai nằm lên mặt bên (khoảng vài phút cho mỗi mặt bên) để bệnh phẩm được tráng đều lên 2 mặt thạch. Sau đó dựng đứng chai lên, nới lỏng nắp trong, đậy nắp ngoài lên, cho vào bình nến và để vào tủ ấm 35-37°C. Nếu là tủ ấm $CO_2$ thì không cần cho vào bình nến.

- Quan sát khóm vi khuẩn mọc trên hai mặt thạch mỗi ngày trong 2 ngày.
- Do mặt thạch cấy bệnh phẩm là thạch CAXV giàu bổ dưỡng và giàu XV, do vậy tất cả các vi khuẩn dù khó mọc như *H. influenzae, N. meningitidis, S. pneumoniae* đều có thể mọc được. Khi thấy có sự hiện diện của bất kỳ khúm vi khuẩn nào mọc trên mặt thạch thì phải làm phết nhuộm Gram để quan sát hình thái vi khuẩn và tiến hành định danh, kháng sinh đồ theo hướng mà hình ảnh Gram vi khuẩn gợi ý.

## PHỤ LỤC 2 :

## MENINGITEX – phát hiện nhanh kháng nguyên hoà tan các vi khuẩn thường gây viêm màng não mủ

### Nguyên tắc thử nghiệm

Thử nghiệm thực hiện dựa theo nguyên tắc của phản ứng tụ latex, các kháng thể đặc hiệu được gắn trên hạt latex sẽ bị tụ lại khi gặp các kháng nguyên tương ứng và hiện tượng tụ này sẽ thấy được bằng mắt thường.

### Thành phần thuốc thử

Một bộ thuốc thử gồm 5 tube nắp chặt chứa thuốc thử là 1 ml huyền dịch các hạt latex đã được gắn kháng thể đặc hiệu *Neisseria meningitidis* group A (lọ NMA), *Neisseria meningitidis* group B (lọ NMB), *Neisseria meningitidis* group C (lọ NMC), *Haemophilus influenzae* (lọ Hib) và *Streptococcus pneumoniae* (1 lọ PNE). Ngoài ra còn có lọ chứa 200µl kháng nguyên chứng (lọ C [+]). Hộp thuốc thử phải được bảo quản tại nhiệt độ 4°C, có hạn dùng 2 năm từ sau ngày sản xuất.

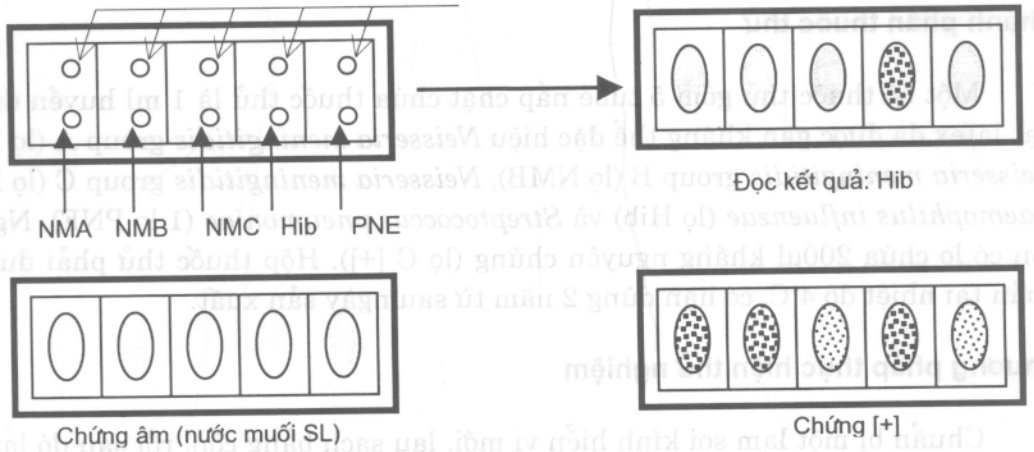
### Phương pháp thực hiện thử nghiệm

Chuẩn bị một lam soi kính hiển vi mới, lau sạch bằng cồn, rồi sau đó lau khô. Nhớ khi cầm lam phải cầm trên cạnh lam chứ không cầm trên mặt lam. Dùng bút aceton hay bút mỡ kẻ 5 ô trên lam. Nhỏ lên mỗi ô một giọt (khoảng 10µl) dịch não tủy (DNT). Lắc mạnh các tube thuốc thử MENINGITEX để thành huyền dịch đục đều như sữa. Sau đó nhỏ trên ô đầu tiên một giọt (khoảng 10µl) NMA, ô thứ 2 một giọt (khoảng 10µl) NMB, ô thứ 3 một giọt (khoảng 10µl) NMC, ô thứ 4 một giọt (khoảng 10µl) Hib, ô thứ 5 một giọt (khoảng 10µl) PNE. Thay đầu côn sau mỗi lần lấy và nhỏ thuốc thử trên lam. Dùng que tăm trộn đều giọt thuốc thử vào giọt dịch não tủy, vừa trộn vừa trải rộng hỗn hợp ra cho gần đầy mặt ô, nhớ thay que tăm

sau khi trộn hỗn hợp trong mỗi ô. Sau khi trộn xong, giữ cạnh lam giữa hai ngón trỏ và cái, lắc nghiêng tới rồi nghiêng lui trong vòng 3 phút, vừa lắc vừa quan sát xem ô nào tụ lại để ghi nhận kết quả [+] kháng nguyên hòa tan của vi khuẩn gây bệnh có trong dịch não tủy tương ứng với kháng thể đặc hiệu có trong giọt thuốc thử. Có hiện tượng tụ trong ô khi các hạt latex không còn ở dạng huyền dịch đục đều như sữa mà tụ lại thành hạt lợn cợn trắng trên nền dung dịch trong dần đi. Hạt lợn cợn trắng càng lớn khi phản ứng tụ càng mạnh, càng nhỏ khi phản ứng tụ càng yếu. Nếu sau 3 phút phản ứng tụ chưa thấy rõ, có thể quan sát qua một gương lõm ảnh phản chiếu của các ô qua gương lõm để phát hiện hiện tượng tụ.

### Kiểm tra thuốc thử

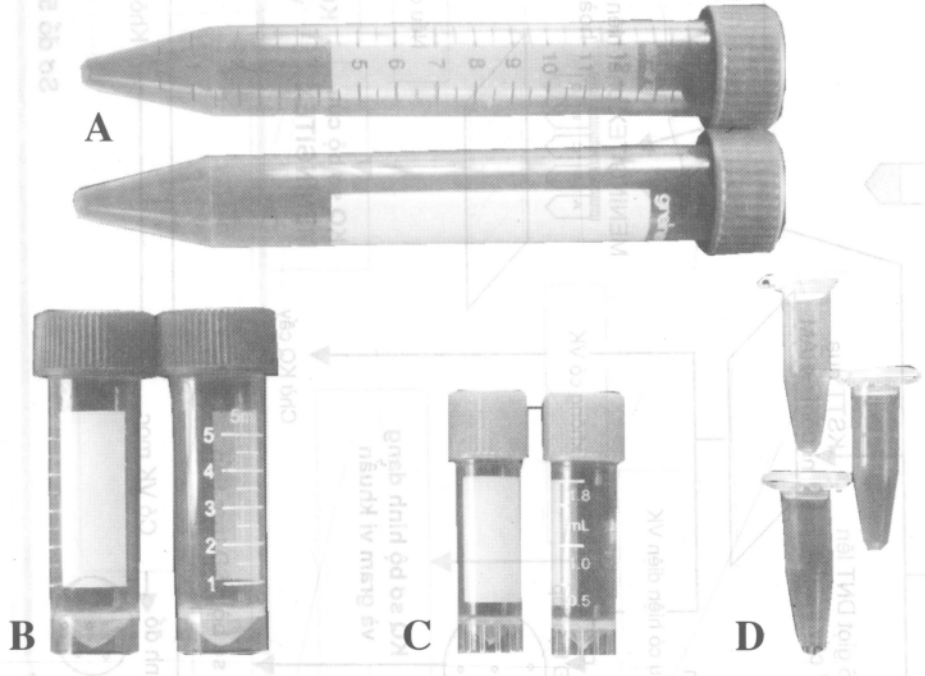
Cứ mỗi vài tháng kiểm tra thuốc thử xem có còn đủ nhạy không với chứng [+] và với nước muối sinh lý. Thực hiện trên 2 lam soi kính hiển vi, mỗi lam cũng kẻ 5 ô. Thực hiện như trên nhưng trên một lam, thay vì nhỏ vào mỗi ô 1 giọt DNT, cho vào mỗi ô một giọt 10 µl chứng [+] (từ lọ C [+]) và trên lam kia cũng thay vì nhỏ vào mỗi ô 1 giọt DNT thì nhỏ vào mỗi ô một giọt 10 µl nước muối sinh lý. Thuốc thử còn hiệu lực khi cả 5 ô nhỏ chứng [+] đều có hiện tượng tụ so với cả 5 ô nhỏ nước muối sinh lý đều không có hiện tượng tụ.



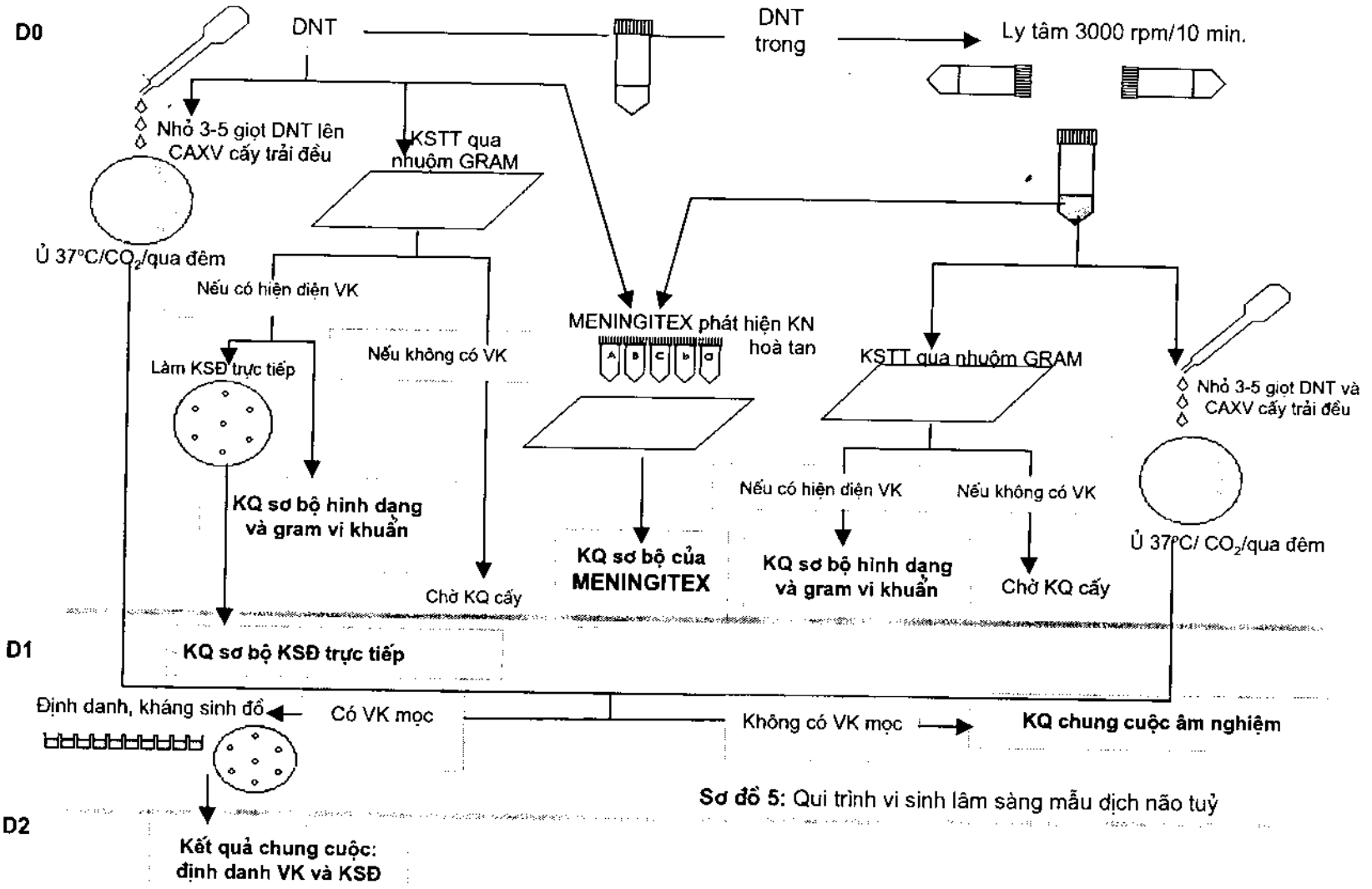

**Hình 5.3:** Mô tả cách làm xét nghiệm phát hiện các vi khuẩn gây bệnh có trong dịch não tuỷ bằng bột thuốc thử MENINGITEX



**Hình 5.4:** Chai 2 mặt thạch CAXV cấy dịch não tuỷ và các dịch không tạp nhiễm khác, rất thích hợp trong các phiên trực khi phòng thí nghiệm không có nhân viên trực chuyên khoa vi sinh




**Hình 5.5:** Các phương tiện thích hợp để lấy dịch não tuỷ có thể là:
(A) Tube ly tâm vô trùng 15ml nắp vặn (trái ), (B) tube vô trùng 5ml, tube vô trùng 1,8ml và (D) tube nắp bật kiểu Eppendorf biopure




**Sơ đồ 5:** Qui trình vi sinh lâm sàng mẫu dịch não tuỷ

# BÀI 6. MẪU QUỆT HẦU, HỌNG VÀ CẤY MẪU QUỆT HẦU HỌNG

**MỤC TIÊU**

1. *Thực hiện được cách lấy cũng như hướng dẫn được lâm sàng lấy được bệnh phẩm này nhờ biết được cách quệt hầu họng.*
2. *Thực hiện được qui trình vi sinh lâm sàng mẫu quệt hầu họng để có thể phân lập được các vi khuẩn đích mà yêu cầu của lâm sàng muốn tìm.*
3. *Chọn lựa và sử dụng đúng các phương tiện để khảo sát được vi sinh lâm sàng mẫu quệt hầu họng nhắm vào các vi khuẩn đích cần tìm theo yêu cầu của lâm sàng nhờ biết được phương tiện cần thiết và thích hợp nhất để thực hiện được xét nghiệm vi sinh lâm sàng quệt hầu họng.*

## 1.CHỈ ĐỊNH

- Quệt hầu hay quệt họng được chỉ định trước các bệnh nhân cần xác định có phải bị nhiễm trùng vùng hầu, họng do vi khuẩn hay không. Nghĩa là nên có chỉ định quệt hầu, họng trước các bệnh nhân có các triệu chứng: đau, rát vùng hầu, họng. Khám thấy niêm mạc hầu họng sưng đỏ, phù nề, viêm amidan, có màng mủ hay màng giả, phù nề lưỡi, lưỡi đỏ dâu tây và sưng hạch cổ.
- Ngoài ra quệt hầu, họng còn có khi được chỉ định để phát hiện người lành mang vi khuẩn như *S. aureus, N. meningitidis, S. pyogenes* (nhóm A), *C. diphtheria.*

## 2. THỜI ĐIỂM QUỆT HẦU, HỌNG

Phải lấy mẫu trước khi bệnh nhân dùng kháng sinh hệ thống.

## 3. CÁCH LẤY MẪU

- Cho bệnh nhân ngồi, đầu hơi ngửa ra sau. Yêu cầu bệnh nhân há miệng ra, có thể vừa há miệng vừa phát âm A..A..A..
- Dùng cây đè lưỡi, đè lưỡi của bệnh nhân để thấy rõ họng.
- Lấy tăm bông vô trùng (*tăm bông vô trùng lấy mẫu*) quệt vào vùng amidan, vùng thành sau họng hay vùng bị viêm nhiễm. Tránh quệt vào lưỡi hay vòm khẩu cái hay niêm mạc má, miệng.

- Cho tăm bông vào tube nắp chặt vô trùng rồi gửi ngay đến phòng thí nghiệm. Nếu chậm trễ hơn 4 giờ thì cho tăm bông vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies.

## 4. KHẢO SÁT TRỰC TIẾP

- Làm phết nhuộm gram (sau khi tiến hành nuôi cấy nếu bệnh phẩm chỉ là một que tăm bông) và tùy yêu cầu của bác sĩ lâm sàng, xét nghiệm viên có thể tìm:
  + Có vi khuẩn dạng bạch hầu không?
  + Có thoi xoắn khuẩn không?
  + Có nấm men không?
  + Sự hiện diện của các vi khuẩn khác như liên cầu, tụ cầu là không có giá trị vì các dạng vi khuẩn này có thể thấy nhiều trong quệt hầu họng người bình thường.
- Nếu có yêu cầu của bác sĩ là tìm vi khuẩn bạch hầu thì làm phết nhuộm với xanh methylen kiềm.

## 5. NUÔI CẤY

### 5.1. Trường hợp tìm bạch hầu

- Cấy trên thạch Loeffler, ủ 35-37°C trong 6-8 giờ rồi sau đó cấy lại trên thạch máu (BA) có thêm tellurit để chọn lọc.
- Cũng có thể cấy trên BA -tellurit ngay trong ngày đầu.
- Sau khi ủ trong 24-48 giờ, nếu có vi khuẩn mọc thì nhuộm gram, nếu phát hiện có vi khuẩn dạng bạch hầu thì tiếp tục định danh và làm thử nghiệm tìm độc tố để xác định vi khuẩn bạch hầu gây bệnh.

### 5.2. Trường hợp tìm liên cầu

- Cấy trên một hộp thạch máu có gentamicin (BA-Ge) và có thể thêm một hộp thạch BA hay BA có nalidixic acid (BANg). Có thể đặt ở vùng có mầm cấy nhiều nhất một đĩa bacitracin và một đĩa co -trimoxazol. Ủ hộp thạch trong bình nến, trong tủ ủ 35-37°C, để qua đêm.
- Nếu có nhiều khóm liên cầu tan huyết β mọc trên hộp thạch, có thể đoán biết liên cầu thuộc nhóm nào.
  + Nhóm A: nếu nhạy bacitracin, kháng co -trimoxazol
  + Nhóm B, D: nếu kháng bacitracin, kháng co -trimoxazol
  + Nhóm C, G, F: nếu kháng bacitracin, nhạy co -trimoxazol
- Nếu ít khóm liên cầu mọc, tiến hành cấy thuần khiết rồi định danh sau.

- Trên hộp thạch máu có thể tìm được *Staphylococci, S. pneumoniae*. Nhưng các vi khuẩn này chỉ phân lập và phúc trình kết quả cho bác sĩ lâm sàng có yêu cầu rõ ràng, hay khi có yêu cầu tìm người lành mang trùng.
- Nếu là liên cầu tan huyết nhóm A, không cần thiết phải làm kháng sinh đồ vì vi khuẩn nhạy cảm 100% với penicillin, nếu là các liên cầu nhóm khác thì có thể làm kháng sinh đồ.

### 5.3. Trường hợp tìm H. influenzae

Cấy thêm hộp thạch CAHI (CA máu ngựa và có thêm bacitracin) như trong trường hợp mẫu đờm.

### 5.4. Nếu có yêu cầu tìm N. gonorrhoeae (viêm họng do lậu cầu), hay tìm N.meningitidis (phát hiện tình trạng mang trùng)

Cấy thêm hộp thạch CATM (thạch nâu Thayer Martin), ủ bình nến 35-37°C qua đêm hay 24-48 giờ. Định danh khóm nghi ngờ.

### 5.5. Nếu không có một yêu cầu rõ ràng của bác sĩ lâm sàng

Chỉ thực hiện nuôi cấy tìm vi khuẩn đích là liên cầu tan huyết beta.

## 6. PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH HỌC

- Mục đích tìm kháng nguyên đặc hiệu liên cầu tan huyết beta thuộc nhóm A
- Có nhiều phương pháp như ELISA, sắc ký miễn dịch, tụ latex. Phương pháp tụ latex hay sắc ký miễn dịch là thích hợp để thực hiện ngay tại nơi khám bệnh nhất.
- Các phương pháp này có độ nhạy và đặc hiệu khá cao.
- Tất cả các phương pháp này đều dễ dàng thực hiện tại các phòng khám.

## 7. CẤY QUỆT HẦU HỌNG – CÁC CÂU HỎI THƯỜNG GẶP

### 7.1. Mẫu quệt hầu họng có cần phải cho vào môi trường cuyên chở Stuart – Amies không?

- Thông thường với vi khuẩn đích cần tìm là liên cầu tiêu huyết nhóm A hay tụ cầu thì không cần phải cho mẫu quệt hầu họng vào môi trường chuyên chở nếu mẫu được cấy trong vòng 4 giờ sau khi lấy.
- Tuy nhiên nếu vi khuẩn đích cần tìm là *S. pneumoniae, N. meningitidis, N. gonorrhoeae* thì nên cho vào môi trường chuyên chở vì các vi khuẩn này rất khó mọc và dễ bị chết trong môi trường ngoài cơ thể.
- Nếu vi khuẩn đích là bạch hầu thì cũng không cần dùng môi trường chuyên chở vì yêu cầu tìm bạch hầu là yêu cầu khẩn, phòng thí nghiệm phải làm ngay sau khi có mẫu mà không được chậm trễ.

**7.2. Nếu kết quả cấy quệt hầu họng có *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* hay *N. meningitidis* thì đây có phải là các vi khuẩn gây viêm họng không và có cần trả lời cho lâm sàng không?**

- Các vi khuẩn trên đều có thể là vi khuẩn thường trú ở hầu họng, không phải là tác nhân gây viêm họng. Riêng *H. influenzae*, nếu là type B thì có thể là tác nhân gây viêm họng.
- Khi kết quả cấy là một trong các vi khuẩn trên thì có thể trả lời cho lâm sàng nếu có yêu cầu rõ ràng tìm các vi khuẩn trên, nhưng phải ghi chú đây có thể là vi khuẩn thường trú không gây bệnh viêm hầu họng.

**7.3. Xin cho biết giá trị của các thử nghiệm hoá miễn dịch (sắc ký miễn dịch hay tụ latex) phát hiện trực tiếp và nhanh liên cầu tiêu huyết nhóm A trong quệt họng?**

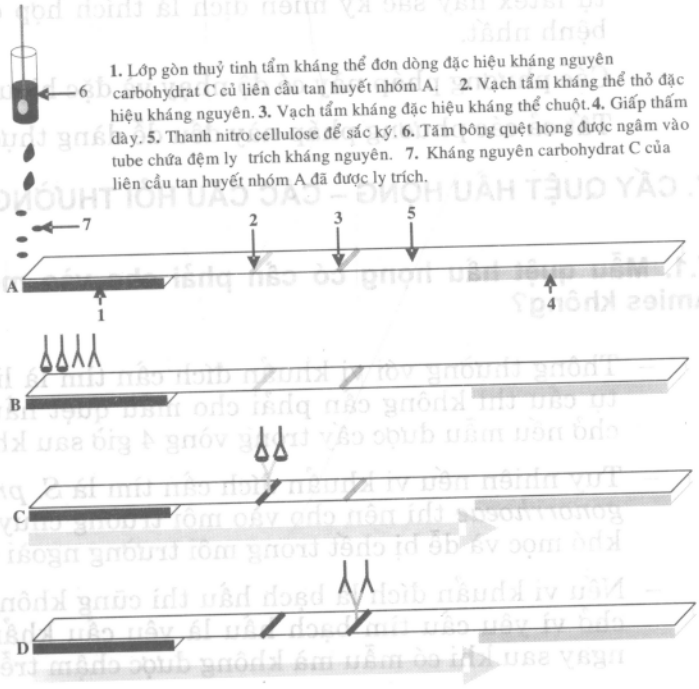
- Đây là các thử nghiệm hoá miễn dịch phát hiện kháng nguyên carbohydrat C đặc trưng của liên cầu tan huyết nhóm A trong hầu họng.
- Các thử nghiệm này có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao, không thua gì nuôi cấy. Lại có thể thực hiện rất dễ dàng tại các phòng mạch hay phòng khám và kết quả cũng rất nhanh chỉ trong vòng không quá 10 phút sau khi lấy mẫu. Chính vì vậy đây là thử nghiệm nên có tại các phòng mạch hay phòng khám vì viêm họng là một bệnh cảnh rất thường gặp và yêu cầu tìm liên cầu tan huyết nhóm A cũng là một yêu cầu rất cần thiết để giúp chẩn đoán phân biệt với các tác nhân viêm họng khác cũng như giúp bác sĩ có ngay chỉ định điều trị chính xác ngay từ đầu. Hình dưới đây mô tả nguyên tắc hoạt động của thử nghiệm.

A. Cho tăm bông quệt họng vào tube chứa đệm ly trích kháng nguyên carbohydrate C đặc hiệu liên cầu tan huyết beta nhóm A. Kháng nguyên được ly trích sẽ thấm vào lớp gòn thuỷ tinh có tẩm kháng thể đơn dòng gắn màu đặc hiệu kháng nguyên

B . Kháng nguyên được ly trích sẽ bị kháng thể đơn dòng gắn màu (có thể là các hạt vàng thể keo) tóm tắt

C. Phức hợp kháng nguyên – kháng thể sẽ di chuyển sắc ký dần lên trên và sẽ bị vạch tẩm kháng thể thỏ đặc hiệu kháng nguyên tóm tắt, nhờ đó phức hợp sẽ tập trung nhiều trên vạch này và làm vạch trở nên sậm màu. Kết quả như vậy là [+]

D. Kháng thể đơn dòng thừa tiếp tục di chuyển lên trên và sẽ bị vạch tẩm kháng thể đặc hiệu kháng thể chuột tóm bắt, nhờ vậy vạch trở nên sậm màu. Kết quả này chứng tỏ hệ thống hoạt động tốt




1. Lớp gòn thuỷ tinh tẩm kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên carbohydrat C củ liên cầu tan huyết nhóm A. 2. Vạch tẩm kháng thể thỏ đặc hiệu kháng nguyên. 3. Vạch tẩm kháng đặc hiệu kháng thể chuột. 4. Giấp thấm dày. 5. Thanh nitro cellulose để sắc ký. 6. Tăm bông quệt họng được ngâm vào tube chứa đệm ly trích kháng nguyên. 7. Kháng nguyên carbohydrat C của liên cầu tan huyết nhóm A đã được ly trích.

**Hình 6.1:** Nguyên tắc thử nghiệm sắc ký miễn dịch phát hiện kháng nguyên carbohydrate C đặc hiệu liên cầu tan huyết beta nhóm A trong các quệt hầu họng

## 8. CÂU HỎI ÔN TẬP

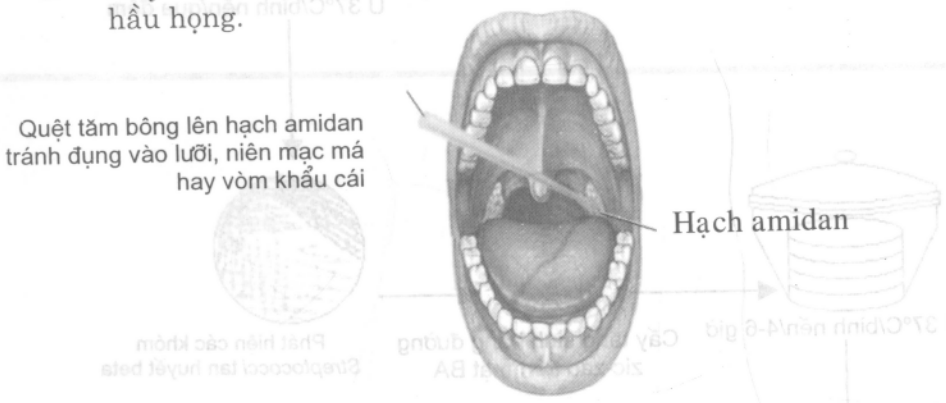
a. Cho biết các chỉ định lâm sàng để lấy mẫu quệt hầu họng khảo sát vi sinh lâm sàng.

b. Hãy cho biết các cách lấy và chuyên chở mẫu quệt hầu họng đến phòng thí nghiệm để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

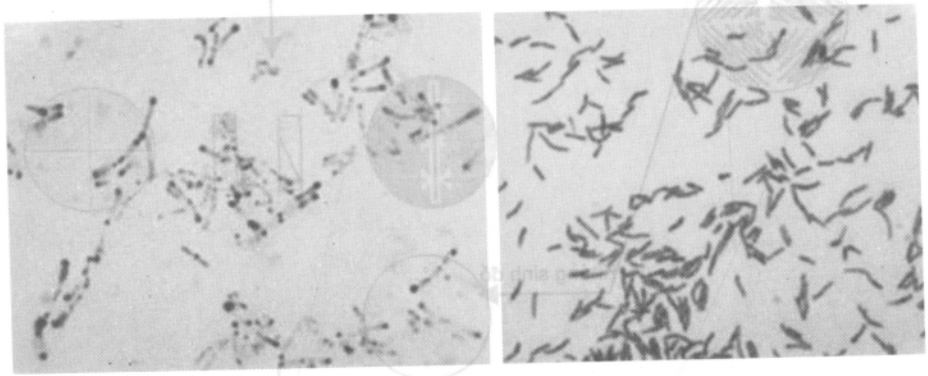
c. Hãy cho biết phương tiện lấy và chuyên chở mẫu quệt hầu họng thích hợp nhất cho các bệnh viện hiện nay và phân tích các ưu khuyết điểm của các phương tiện này.

d. Hãy cho biết qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng thực hiện tại phòng thí nghiệm đối với bệnh phẩm quệt hầu họng để phát hiện liên cầu tiêu huyết nhóm A và để phát hiện các vi khuẩn đích khác theo yêu cầu của lâm sàng.

e. Hẫy cho biết các vi khuẩn gây bệnh cần phải phân lập trong mẫu quệt hầu họng.

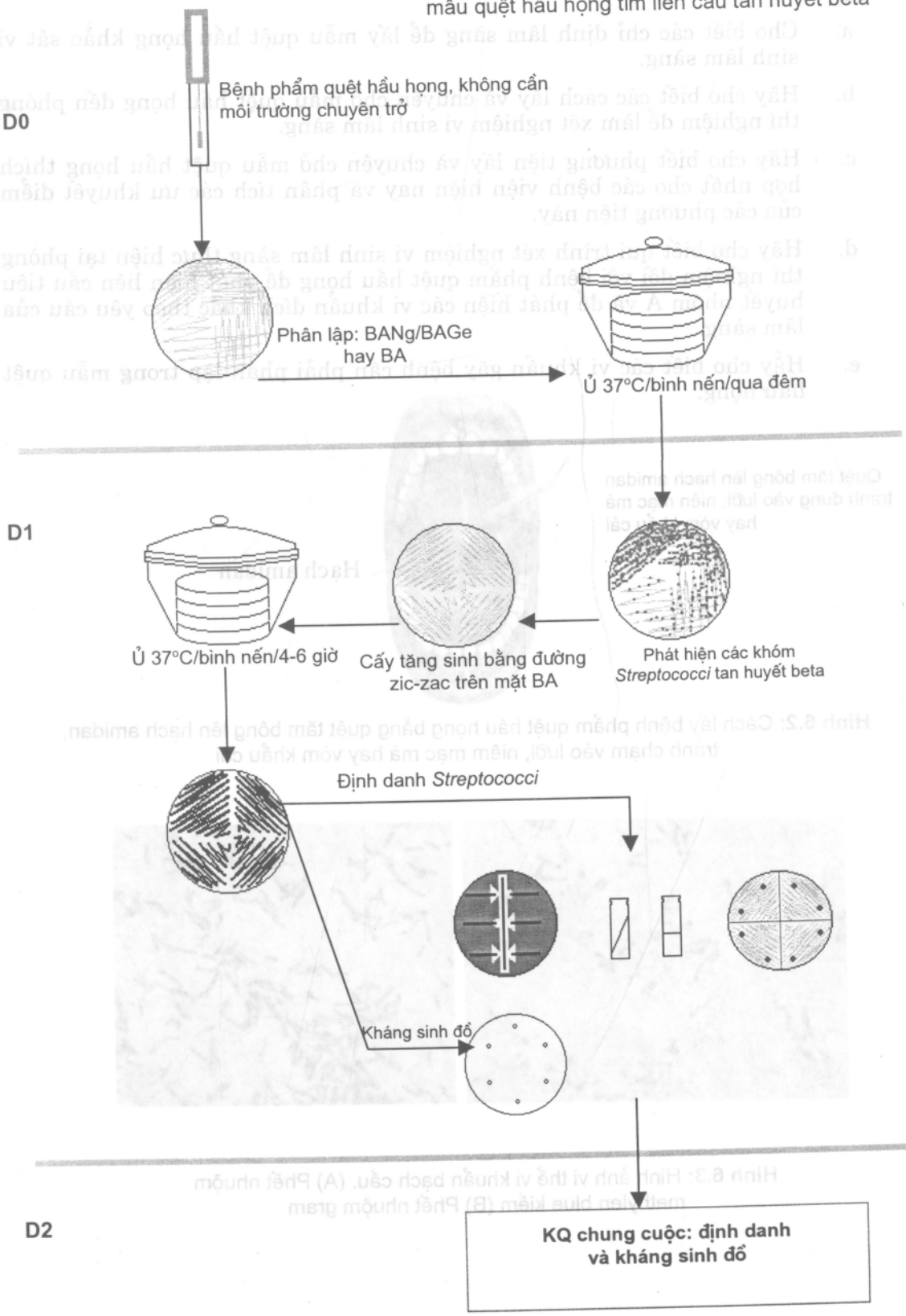



**Hình 6.2:** Cách lấy bệnh phẩm quệt hầu họng bằng quệt tăm bông lên hạch amidan, tránh chạm vào lưỡi, niêm mạc má hay vòm khẩu cái



**Hình 6.3:** Hình ảnh vi thể vi khuẩn bạch cầu. (A) Phết nhuộm methylen blue kiềm (B) Phết nhuộm gram

**Sơ đồ 6:** Qui trình vi sinh lâm sàng khảo sát mẫu quệt hầu họng tìm liên cầu tan huyết beta



# BÀI 7. BỆNH PHẨM TAI, MẮT, MŨI, XOANG VÀ CẤY BỆNH PHẨM TAI, MẮT, MŨI, XOANG

**MỤC TIÊU**

1. *Hướng dẫn được lâm sàng hay thậm chí có thể thực hiện được tốt bước lấy và chuyên chở mẫu nhờ biết được cách lấy và chuyên chở các mẫu bệnh phẩm tai mắt mũi xoang.*
2. *Thực hiện được đầy đủ các bước trong qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng các mẫu bệnh phẩm lấy từ tai, mắt, mũi xoang để không bỏ sót các cơ hội phát hiện các tác nhân vi khuẩn gây bệnh.*
3. *Sử dụng được phương tiện cần thiết và thích hợp nhất để thực hiện được xét nghiệm vi sinh lâm sàng các bệnh phẩm lấy từ tai, mắt, mũi, xoang; nhờ vậy có thể phát hiện được các tác nhân gây bệnh cho dù là các tác nhân rất khó mọc.*

## 1. CHỈ ĐỊNH

- Các bệnh phẩm tai, mắt, mũi, xoang được chỉ định lấy trước các trường hợp viêm cấp tính hay mạn tính các vùng tai, mắt, mũi, xoang.
- Cụ thể là viêm tai ngoài cấp tính, viêm tai giữa cấp hay mạn tính, viêm xoang cấp hay mạn tính, viêm mũi cấp hay mạn tính, viêm kết mạc cấp hay mạn tính.

## 2. THỜI ĐIỂM LẤY BỆNH PHẨM

Tốt nhất là trước khi bệnh nhân dùng kháng sinh hệ thống hay tại chỗ.

## 3. CÁCH LẤY BỆNH PHẨM

### 3.1. Trường hợp viêm tai ngoài

- Nếu chưa vỡ mủ, sát trùng da bằng cồn 70%, chờ khô, sau đó chọc hút hay rạch lấy mủ cho vào tube vô trùng (*tube nắp vàng vô trùng hay tube Eppendorf biopure*). Nếu đã vỡ mủ, lau sạch mủ rồi dùng tăm bông vô trùng ép nặn mủ thấm vào tăm bông (dùng *tăm bông vô trùng lấy mẫu*). Các mẫu mủ lấy không có môi trường chuyên chở phải gửi ngay đến phòng thí nghiệm để yêu cầu cấy ngay.

- Thích hợp nhất là dùng tăm bông thấm hay lấy mủ cho vào môi trường chuyên chở (dùng *cặp tube đũa tăm bông vô trùng/tube đũa Stuart Amies* hay *cặp tube đũa tăm bông mảnh vô trùng*/tube đũa Stuart -Amies*) lấy hay thấm mủ. Mủ lấy ra, có thể cho vào lọ hay tube nắp chặt vô trùng hay thấm vào tăm bông vô trùng rồi cho vào tube nắp chặt vô trùng, gửi ngay đến phòng thí nghiệm. Trong trường hợp chậm trễ thì cho vào tube môi trường chuyên chở Stuart -Amies rồi gửi đến phòng thí nghiệm.

### 3.2. Trường hợp viêm tai giữa

- Nếu cấp tính và chưa vỡ mủ, bác sĩ chuyên khoa lấy qua chọc hút xuyên màng nhĩ cho vào tube vô trùng (*tube nắp vàng vô trùng hay tube Eppendorf biopure*). Nếu đã vỡ mủ hay chảy mủ mạn tính, lau sạch mủ vùng tai ngoài rồi dùng tăm bông vô trùng thấm mủ vào tăm bông (dùng *tăm bông vô trùng lấy mẫu, hay tốt nhất là tăm bông mảnh vô trùng**). Các mẫu mủ lấy không có môi trường chuyên chở phải gửi ngay đến phòng thí nghiệm để yêu cầu cấy ngay...
- Thích hợp nhất là dùng tăm bông thấm hay lấy mủ cho vào môi trường chuyên chở (dùng *cặp tube đũa tăm bông vô trùng/tube đũa Stuart Amies* hay *cặp tube đũa tăm bông mảnh vô trùng*/tube đũa Stuart -Amies*) lấy hay thấm mủ. Mủ lấy ra, có thể cho vào lọ hay tube nắp chặt vô trùng hay thấm vào tăm bông vô trùng rồi cho vào tube nắp chặt vô trùng, gửi ngay đến phòng thí nghiệm. Trong trường hợp chậm trễ thì cho vào tube môi trường chuyên chở Stuart -Amies rồi gửi đến phòng thí nghiệm.

### 3.3. Trường hợp viêm xoang

- Nếu cấp tính thì lấy quệt mũi sau hay quệt mủ khe giữa. Để lấy quệt mũi sau, bác sĩ chuyên khoa dùng kẹp nong mũi bệnh nhân rồi lấy quệt mũi sau bằng một tăm bông nhỏ, cọng mềm (tăm bông mảnh vô trùng*), luồn từ lỗ mũi qua vách mũi trước và mũi sau, đưa sâu vào trong cho đến khi cản lại là hầu. Để lấy quệt mủ khe giữa cần phải lấy qua nội soi tai mũi họng. Quệt mũi sau và quệt mủ khe giữa được cho vào tube vô trùng hay vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies rồi gửi đến phòng thí nghiệm (dụng cụ thích hợp nhất để lấy mẫu như vậy là *cặp tube đũa tăm bông mảnh vô trùng/tube đũa Stuart -Amies*)
- Nếu mạn tính, lấy mẫu thử là mẫu sinh thiết hay dịch rửa xoang bằng nước muối sinh lý không có chất sát trùng. Mảnh sinh thiết hay dịch rửa được cho vào lọ vô trùng (dùng *lọ vô trùng lấy mẫu*) hay tube vô trùng (*tube Eppendorf biopure*) rồi gửi ngay đến phòng thí nghiệm.

*Trường hợp vùng phải lấy mủ quá hẹp như mủ khe giữa, mủ tai ngoài, mủ tai giữa

### 3.4. Trường hợp viêm mũi

- Bác sĩ chuyên khoa lấy quệt mũi sau hay quệt mủ khe giữa rồi gửi đến phòng thí nghiệm.
- Quệt mũi trước chỉ được lấy để khảo sát tình trạng mang vi khuẩn *S. pneumoniae, H. influenzae* ở các bệnh nhân trẻ em bị nhiễm trùng hô hấp cấp. Ngoài ra, quệt mũi trước còn được lấy để điều tra tình trạng người lành mang *S. aureus*. Dụng cụ thích hợp nhất để lấy quệt mũi trước là dùng *cặp tube đũa tăm bông vô trùng/tube đũa Stuart – Amies*.

### 3.5. Trường hợp viêm kết mạc mắt

- Bệnh phẩm là quệt mủ kết mạc mắt được bác sĩ chuyên khoa lấy bằng kỹ thuật vô trùng.
- Dụng cụ thích hợp nhất để lấy mẫu là *cặp tube đũa tăm bông vô trùng/tube đũa Stuart Amies* hay *cặp tube đũa tăm bông mảnh vô trùng */tube đũa Stuart – Amies*.

## 4. CÁC VI KHUẨN GÂY BỆNH CÓ THỂ TÌM THẤY TRONG BỆNH PHẨM

### 4.1. Các trường hợp viêm xoang, mũi cấp tính và mạn tính

- *S. pneumoniae,*
- *H. influenzae,*
- *M. catarrhalis,*
- Các *Streptococci* tan huyết β,
- *S. aureus*,
- *Klebsiella* và các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae,*
- Vi khuẩn kỵ khí (*Bacteroides* và các vi khuẩn khác).

### 4.2. Trường hợp viêm tai giữa cấp

- *S. pneumoniae* và các *Streptococci* khác,
- *M. catarrhalis,*
- *H. influenzae.*

### 4.3. Trường hợp viêm tai giữa mạn tính

- *P.aeruginosa,*
- *Proteus spp.,*

- Các vi khuẩn kỵ khí,
- Các vi khuẩn khác: hiếm gặp.

### 4.4. Trường hợp viêm kết mạc mắt cấp tính hay mạn tính

- *Haemophilus spp.*,
- *Moraxella spp.*,
- *N. gonorrhoeae*,
- *S. aureus*,
- *S. pneumoniae*,
- *S. pyogenes*,
- *P. aeruginosa*,
- Các vi khuẩn khác: hiếm gặp.

## 5. KHẢO SÁT TRỰC TIẾP

- Làm phết nhuộm gram (sau khi tiến hành nuôi cấy nếu bệnh phẩm chỉ là một que tăm bông).
- Ghi nhận sự hiện diện các vi khuẩn trong mẫu và trả lời sơ bộ cho bác sĩ lâm sàng.

## 6. TIẾN HÀNH NUÔI CẤY

### 6.1. Cấy phân lập trên các hộp thạch phân lập, tối thiểu là

- Thạch máu (BA) thường hay BA có nalidixic acid (BANg).
- Có thể thêm BAGe (thạch máu có gentamicin chọn lọc các vi khuẩn *Pneumococci* và *Streptococci*).
- Thạch nâu chọn lọc *H. influenzae* (CAHI).
- Thạch chọn lọc trực khuẩn Gram [-] dễ mọc (EMB hay MC).
- Có thể thêm thạch nâu chọn lọc *Neisseria* (CATM) khi có yêu cầu.
- Có thể thêm Sabouraud Dextrose Agar có hay không có kháng sinh để cấy chọn lọc vi nấm.

Các hộp thạch BA, BAGe, CAHI, CATM phải ủ trong bình nến, các hộp thạch khác ủ khí trường bình thường. Tất cả để trong tủ ủ 35-37°C và quan sát mỗi ngày trong liên tiếp 3 ngày.

**6.2. Các khóm mọc trên hộp thạch phân lập đều phải tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ**

## 7. CẤY BỆNH PHẨM TAI, MẮT, MŨI, XOANG – CÁC CÂU HỎI THƯỜNG GẶP

**7.1. Trước bệnh nhân bị viêm mũi, lâm sàng có khi lấy bệnh phẩm bằng tăm bông cho vào mũi rồi quệt lấy dịch mũi xanh hay vàng chảy ra từ mũi bệnh nhân để làm xét nghiệm vi sinh; cách lấy bệnh phẩm này có giá trị không?**

- Với cách lấy bệnh phẩm trên thì chúng ta chỉ lấy được quệt mũi trước và như vậy thì có thể bệnh phẩm này bị ngoại nhiễm với vi khuẩn thường trú vùng mũi trước như *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, và *S. aureus* mà các vi khuẩn này cũng rất có thể là tác nhân gây viêm mũi hay viêm xoang một khi lan từ nơi thường trú sang xoang hay mũi sau. Chính vì vậy kết quả cấy các bệnh phẩm này không thể khẳng định được tác nhân vi khuẩn phân lập được có phải là tác nhân gây bệnh hay không.
- Vậy thì bệnh phẩm nào là thích hợp nhất trên các bệnh nhân bị viêm mũi? Cũng như trong viêm xoang cấp, bệnh phẩm thích hợp nhất phải là các quệt mủ lấy từ khe giữa của mũi hay là quệt mũi sau. Các bệnh phẩm này không thể lấy được bằng các que tăm bông thông thường vì không thể tránh khỏi bị đụng vào mũi trước khi lấy mẫu. Phương tiện thích hợp nhất để lấy được quệt mủ khe giữa và mủ quệt mũi sau phải là các que tăm bông mảnh làm bằng sợi nhôm. Với que tăm bông này, lâm sàng có thể dễ dàng lấy mẫu quệt mủ khe giữa hay quệt mũi sau qua nội soi hay que kẹp nong lỗ mũi, tránh chạm vào mũi trước.

**7.2. Vì sao tại nhiều bệnh viện, kết quả vi sinh lâm sàng các bệnh phẩm lấy từ tai mắt mũi xoang thường cho kết quả âm tính hay không phù hợp với hiệu quả điều trị kháng sinh trên bệnh nhân?**

- Có thể kết quả âm tính thật sự do bệnh nhân đã điều trị kháng sinh trước làm cho các vi khuẩn không thể phân lập được do đã bị tiêu diệt bởi kháng sinh hay đã lẩn trốn trong các vị trí sâu hơn, cũng có thể tác nhân không phải vi khuẩn mà là các tác nhân khác.
- Những nguyên nhân khác làm kết quả âm tính là có thể liên quan đến vấn đề kỹ thuật như lấy và chuyên chở bệnh phẩm, quan trọng nhất là bệnh phẩm sau khi lấy không cho vào môi trường chuyên chở và khi đến phòng thí nghiệm lại không được cấy ngay trong khi đó đa số các tác nhân gây bệnh đường tai mắt mũi xoang lại là các tác nhân vi khuẩn rất khó mọc như *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, và *M. catarrhalis*. Ngoài ra một nguyên nhân khác rất thường gặp tại các bệnh viện chúng ta hiện nay là phòng thí nghiệm

chỉ dùng các môi trường tự pha chế thông thường như thạch máu người và thạch Mac Conkey hay thậm chí chỉ dùng thạch dinh dưỡng thường (Nutrient Agar) mà khổng dùng các thạch phân lập thích hợp nhất cho các bệnh phẩm lấy từ tai mắt mũi xoang như thạch máu cừu và thạch CAXV để phân lập được các vi khuẩn rất thường gặp nhưng khó mọc nêu trên.

- Nguyên nhân làm cho có sự khác biệt giữa kết quả vi sinh với hiệu quả điều trị kháng sinh trên bệnh nhân có thể là do vi khuẩn phân lập được không phải là vi khuẩn gây bệnh mà chỉ là các vi khuẩn thường trú vùng mũi trước, vùng tai ngoài... và nguyên nhân thường là vì lâm sàng lấy bệnh phẩm bị tạp nhiễm với các vùng này do dùng phương tiện lấy mẫu không thích hợp như đã đề cập ở phần trên; hay cũng có thể vi khuẩn phân lập được chỉ là vi khuẩn tạm trú trong bệnh phẩm ví dụ vi khuẩn tạm trú trong mủ tai ngoài, mủ xoang hay mủ tai giữa chảy vào tai ngoài... và để giải quyết được nguyên do này lâm sàng cần phải chùi sạch mủ ở các vùng trên và chỉ lấy mủ mới chảy ra hay mới nặn ra.

### 7.3. Xin cho biết làm thế nào để có thể lấy bệnh phẩm từ các loét giác mạc?

- Lấy bệnh phẩm từ các loét giác mạc đòi hỏi phải sử dụng một cây nạo bằng kim loại để nạo được vết loét cho vào ống môi trường BHI bổ sung XV rồi mới chuyển về phòng thí nghiệm. Nếu không có cây nạo này, lâm sàng có thể dùng que tăm bông mảnh vô trùng quệt lấy mủ từ vết loét cho vào ống BHI -XV.
- Tại phòng thí nghiệm, ống BHI -XV được ủ trong tủ ấm 35 - 37°C trong 6 giờ hay qua đêm để hôm sau cấy phân lập tiếp lên các môi trường phân lập như đã hướng dẫn trong qui trình. Ống BHI - XV vẫn phải được tiếp tục ủ trong tủ ấm và theo dõi liên tục trong 7 ngày để phát hiện vi khuẩn hay vi nấm mọc nếu lần phân lập đầu không có vi khuẩn mọc.
- Trong trường hợp nghi tác nhân gây bệnh là nấm, thì các nạo hay quệt mủ vết loét phải được cấy ngay trên môi trường Sabouraud Agar bên cạnh việc tăng sinh trong ống BHI – XV.

## 8. CÂU HỎI ÔN TẬP

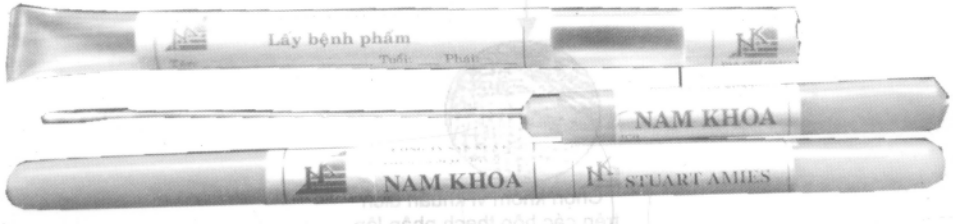
a. Cho biết các chỉ định lâm sàng để lấy các bệnh phẩm từ tai, mắt, mũi, xoang làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

b. Hãy cho biết các các loại bệnh phẩm lấy từ tai, mắt, mũi, xoang và các cách lấy và chuyên chở các loại bệnh phẩm này đến phòng thí nghiệm để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

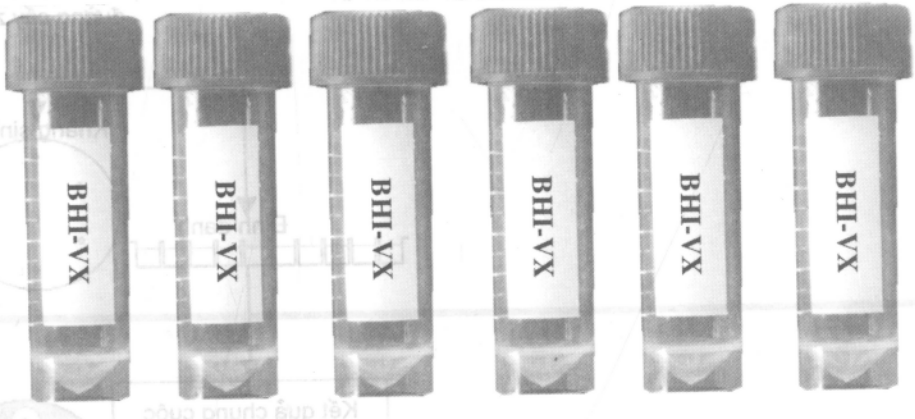
c. Hãy cho biết phương tiện lấy và chuyên chở thích hợp nhất cho các bệnh viện hiện nay để lấy các bệnh phẩm từ tai, mắt, mũi, xoang và phân tích các ưu khuyết điểm của các phương tiện này.

d. Hãy cho biết qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng thực hiện tại phòng thí nghiệm đối với bệnh phẩm lấy từ tai, mắt, mũi, xoang.

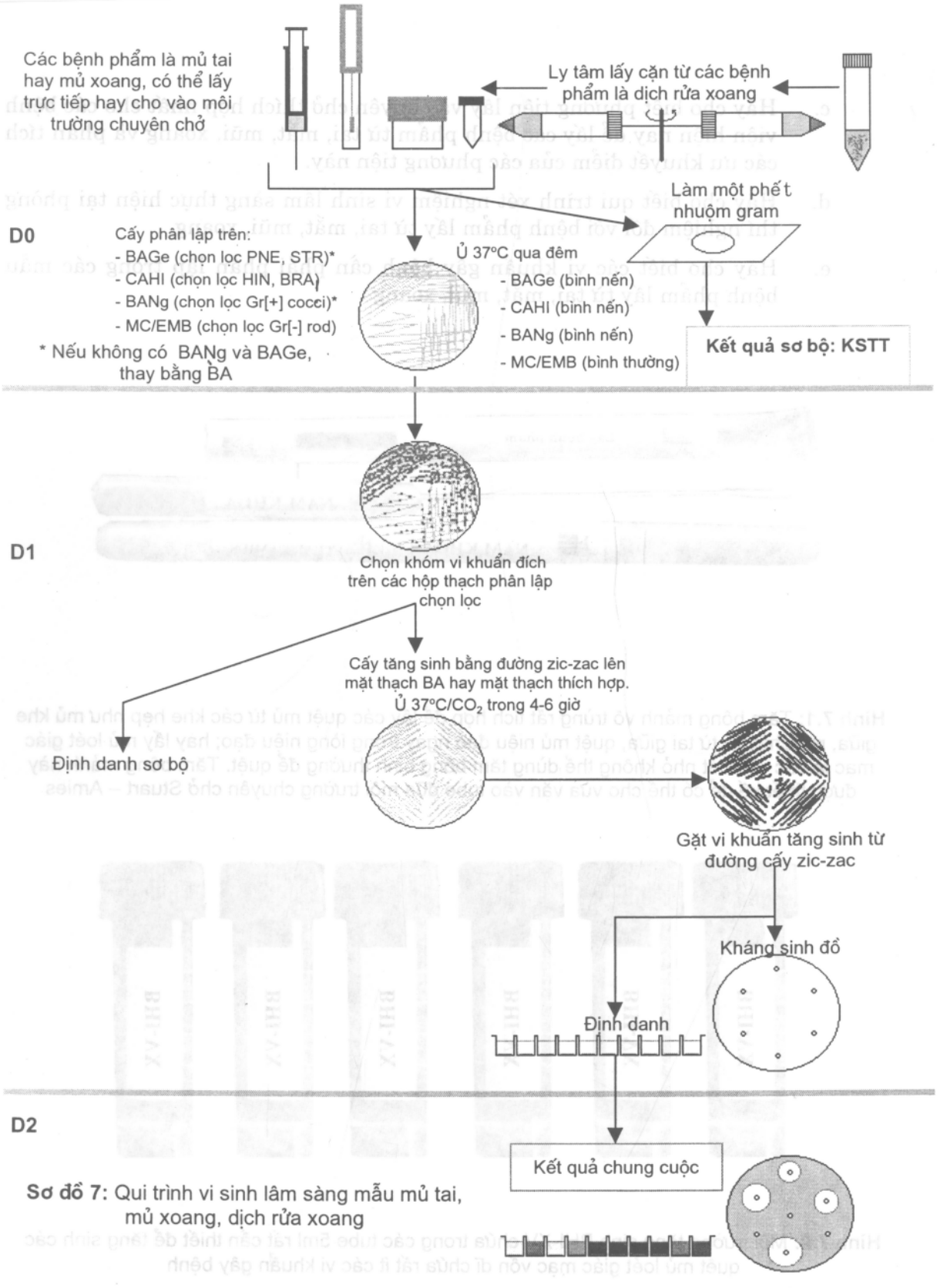
e. Hãy cho biết các vi khuẩn gây bệnh cần phải phân lập trong các mẫu bệnh phẩm lấy từ tai, mắt, mũi, xoang.




**Hình 7.1:** Tăm bông mảnh vô trùng rất tích hợp để lấy các quệt mủ từ các khe hẹp như mủ khe giữa, mủ chảy ra từ tai giữa, quệt mủ niệu đạo ngay trong lòng niệu đạo; hay lấy mủ loét giác mạc là các vết loét nhỏ không thể dùng tăm bông bình thường để quệt. Tăm bông mảnh này được thiết kế để có thể cho vừa vặn vào tube đũa môi trường chuyên chở Stuart – Amies




**Hình 7.2:** Môi trường tăng sinh BHI-XV chứa trong các tube 5ml rất cần thiết để tăng sinh các quệt mủ loét giác mạc vốn dĩ chứa rất ít các vi khuẩn gây bệnh




**Sơ đồ 7:** Qui trình vi sinh lâm sàng mẫu mủ tai, mủ xoang, dịch rửa xoang

# BÀI 8. ĐỜM, DỊCH HÚT ĐỜM QUA MŨI, DỊCH HÚT RỬA PHẾ QUẢN QUA NỘI SOI VÀ CẤY ĐỜM, BỆNH PHẨM CHỨA ĐỜM

**MỤC TIÊU**

1. *Hướng dẫn được lâm sàng cho chỉ định đúng, cũng như hướng dẫn được lâm sàng hay bệnh nhân lấy đúng các loại bệnh phẩm này nhờ biết được các chỉ định, phương pháp và thời điểm để lấy mẫu đờm và các bệnh phẩm có đờm khảo sát vi sinh học.*
2. *Đánh giá được mẫu đờm và các bệnh phẩm có đờm nhờ vậy có thể loại bỏ, không tiến hành nuôi cấy các mẫu không có giá trị, tránh được các kết quả xét nghiệm mẫu đờm không hữu dụng cho lâm sàng.*
3. *Triển khai sử dụng được các phương tiện thích hợp nhất và đầy đủ nhất để có thể phân lập được đúng các vi khuẩn gây bệnh có trong mẫu đờm và các bệnh phẩm có đờm, dù là các vi khuẩn khó mọc nhất, nhờ biết được qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng mẫu đờm và các bệnh phẩm có đờm*

## 1. CHỈ ĐỊNH

- Các trường hợp viêm nhiễm đường hô hấp dưới như viêm phổi, viêm phế quản cấp, cơn cấp của viêm phế quản mạn.
- Nên cho chỉ định lấy mẫu trong các trường hợp bệnh nhân có một trong các triệu chứng sau: ho có máu hay ho nhiều, đau ngực, khó thở, có dấu hiệu đặc phổi như có ran ẩm và rít; giảm tiếng rì rào phế nang; gõ đục khi khám phổi; phim phổi có thâm nhiễm; có nang, có mủ.

## 2. THỜI ĐIỂM LẤY MẪU

- Càng ở giai đoạn sớm của bệnh càng tốt. Nghĩa là tiến hành lấy mẫu ngay sau khi có chẩn đoán lâm sàng.
- Nên lấy mẫu trước khi bệnh nhân dùng kháng sinh hệ thống.

## 3. CÁCH LẤY MẪU

### 3.1. Đờm

- Trước hết cho bệnh nhân súc miệng sạch, không súc miệng bằng nước súc miệng có chất sát trùng.
- Hướng dẫn bệnh nhân hít thật sâu vào rồi hãy cố khạc đờm ra. Có thể giúp bệnh nhân khạc đờm bằng cách vỗ nhẹ vào lưng. Bệnh nhân khạc đờm vào lọ vô trùng, rộng miệng, nắp chặt (dùng *lọ vô trùng lấy mẫu*). Tránh lẫn nước bọt.

### 3.2. Dịch hút đờm trên khí quản qua đường mũi (Naso-Tracheal-Aspirate)

- Trường hợp bệnh nhân không thể khạc được đờm, như ở trẻ em.
- Dùng dụng cụ đặc biệt gọi là bộ hút khí quản (tracheal suction set), là một ống nghiệm gắn với một nắp vặn trên đó có 2 vòi, một nối với một ống thông mềm, một nối với máy bơm chân không đang hoạt động và trên vòi này có một van hông đang mở. Trước hết người mẹ hay thân nhân bệnh nhi ẵm ngửa bé vào lòng, giữ đầu hơi ngửa ra sau. Đưa ống thông qua mũi bệnh nhi cho đến khi đầu ống chạm vào phần trên khí quản, lúc đó bệnh nhi sẽ có phản xạ ho. Ngay lúc bệnh nhi ho, dùng tay bịt chặt van hông lại, nhờ vậy đờm được hút vào ống thông. Sau đó rút ống thông khỏi mũi bệnh nhi, rồi cho đầu ống thông vào một lọ chứa 5ml nước muối sinh lý vô trùng. Nước muối sinh lý sẽ rửa đàm dính ở thành ống thông vào ống nghiệm. Tắt máy bơm, tháo nắp có vòi khỏi ống nghiệm rồi đậy chặt ống nghiệm bằng một nắp vặn khác có trong bộ dụng cụ. Gửi mẫu đến ngay phòng thí nghiệm.
- Nếu không có dụng cụ này, có thể dùng ống chích 60ml, nối một đầu với ống thông mềm để lấy đờm theo cách như trên, nhưng thay vì dùng bơm chân không, hút đờm bằng tay với ống chích trên.

### 3.3. Dịch hút phế quản qua nội soi (BW = Broncho-Washing)

Do bác sĩ chuyên khoa lấy khi đang nội soi, cho vào tube vô trùng nắp chặt rồi gửi ngay đến phòng thí nghiệm.

### 3.4. Các bệnh phẩm khác

Như dịch hút xuyên khí quản, chọc hút phổi, do các bác sĩ chuyên khoa lấy và gửi ngay đến phòng thí nghiệm để khảo sát.

## 4. ĐÁNH GIÁ MỘT MẪU CÓ GIÁ TRỊ ĐỂ KHẢO SÁT VI KHUẨN HỌC

- Vì đờm cũng như dịch hút đờm trên khí quản qua đường mũi (NTA) hay dịch rửa phế quản qua nội soi (BW) có thể bị ngoại nhiễm bởi các vi khuẩn thường trú vùng họng, do đó cần phải đánh giá trước khi tiến hành nuôi cấy.

- Tốt nhất các mẫu sau khi nhận phải được tiến hành khảo sát ngay, không chậm trễ. Nếu vì một lý do gì đó chưa thể khảo sát ngay được, có thể giữ mẫu trong tủ lạnh, nhưng không quá 2 giờ.

### 4.1. Khảo sát đại thể mẫu đờm

Ghi nhận tính chất đại thể của mẫu đờm, các tính chất sau:

- Có nhiều nước bọt không?
- Có mủ (purulent) không, thường màu xanh hay vàng đục?
- Có mủ nhầy (muco-purulent) không?
- Có nhầy (mucoid) không?

Mẫu có lẫn nhiều nước bọt là mẫu không thích hợp để cấy.

### 4.2. Khảo sát vi thể

- Dùng một que tre, gỗ, vòng cấy, hay pipet Pasteur lấy một ít đờm từ vùng nhày mủ, trải đều thành một phết 2 x 3 cm trên một tấm lam. Để khô tự nhiên, sau đó gắn nhẹ trên lửa. Thực hiện phết nhuộm gram.
- Khảo sát dưới kính hiển vi, trước hết dưới quang trường x100 (vật kính x10). Tìm vùng nhày nhớt rồi ghi nhận số lượng tế bào vẩy (squamous cells) là các tế bào có góc cạnh và tế bào bạch cầu hay tế bào mủ (leukocyt hay purulent cells) là các tế bào tròn nhỏ hơn và ăn đậm màu toàn tế bào.

**Bảng 8.1:** Thang điểm Barlett dùng đánh giá mẫu đờm

| Tính chất đại /vi thể | Điểm |
|---|---|
| Mẫu đờm | |
| 10 – 25 bạch cầu | + 1 |
| > 25 bạch cầu | + 2 |
| Nhầy, mủ, mủ nhầy | +1 |
| 10 – 25 tế bào vẩy | - 1 |
| > 25 tế bào vẩy | - 2 |
| Mẫu đờm hút qua mũi (NTA=nasal tracheal suction ), nội soi phế quản | |
| 10 – 25 bạch cầu | + 1 |
| > 25 bạch cầu | + 2 |
| Tế bào trụ | +1 |
| 10 – 25 tế bào vẩy | - 1 |
| > 25 tế bào vẩy | - 2 |

- Mẫu không thích hợp là mẫu có số lượng tế bào vẩy trong một quang trường x100 quá 25 tế bào. Mẫu tin cậy nhất là mẫu có nhiều bạch cầu hay tế bào mủ, quá 25 tế bào trong một quang trường x100. Nói chung, mẫu tin cậy là mẫu có nhiều tế bào bạch cầu (≥ 25), ít tế bào vẩy (= 10), tỷ lệ tế bào bạch cầu/vẩy tốt nhất là ≥ 2,5.
- Để dễ dàng và khách quan, dùng thang điểm Barlett đánh giá mẫu đờm, trong đó kết hợp cả quan sát đại thể lẫn vi thể để cho điểm.

Thang điểm để đánh giá là cộng tất cả các điểm lại rồi đánh giá như sau:

≤ 0 không tin cậy để cấy.

1-2 tin cậy vừa.

≥ 3 rất đáng tin cậy.

Đơn giản hơn, có thể đánh giá dựa vào số lượng tế bào vẩy và tế bào bạch cầu trên một quang trường x100. Mẫu hoàn toàn tin cậy để cấy khi có ≥ 25 bạch cầu và ≤ 10 tế bào vẩy. Mẫu hoàn toàn không tin cậy khi có ≤ 25 bạch cầu và ≥10 tế bào vẩy, đây là mẫu chỉ là nước bọt hay dịch tiết vùng hầu họng. Mẫu tin cậy vừa khi có khi có ≥ 25 bạch cầu và > 10 tế bào vẩy, đây là mẫu bị ngoại nhiễm nước bọt hay dịch tiết vùng hầu họng.

Sau khi đánh giá, chuyển sang vật kính dầu (x100), quan sát vùng nhầy nhớt và quanh tế bào bạch cầu để ghi nhận sự hiện diện các vi khuẩn theo như bảng 8.2.

**Bảng 8.2:** Các tính chất vi thể của các loại vi khuẩn đích có thể quan sát được trong phết nhuộm vi thể

| Tính chất | Nghi VK đích | Tính chất | Nghi VK đích |
|---|---|---|---|
| Cầu khuẩn gram [+] xếp thành chùm | *Staphylococci* | Cầu khuẩn gram [+] xếp đôi | *Pneumococci* |
| Cầu khuẩn gram [+] xếp chuỗi | *Streptococci* | Cầu khuẩn gram [-] xếp đôi | *M. catarrhalis* |
| Trực khuẩn gram [-] nhỏ | *Haemophilus* | Trực khuẩn gram [-] lớn | Trực khuẩn gram [-] dễ mọc |

## 5. CẤY PHÂN LẬP VI KHUẨN GÂY BỆNH

- Tất cả các mẫu đờm sau khi đánh giá nếu tin cậy thì tiến hành nuôi cấy ngay. Các mẫu không tin cậy thì không tiến hành nuôi cấy mà yêu cầu lâm sàng lấy mẫu lại. Riêng các mẫu tin cậy vừa, có thể yêu cầu lấy mẫu lại hay cũng có thể tiến hành nuôi cấy nhưng phải cố lấy mầm cấy là vùng đờm mủ, tránh lấy nhớt hay nước bọt để nuôi cấy.
- Mỗi một mẫu đờm phải được tiến hành nuôi cấy 3 chiều trên các môi trường phân lập đủ khả năng để cấy ra được các vi khuẩn gây bệnh dù khó mọc. Trình bày dưới đây là các môi trường phân lập cần phải được sử dụng để cấy đờm và các bệnh phẩm có đờm

### 5.1. Phân lập cầu khuẩn Gram [+]

- *Thạch máu cừu (BA)* phân lập không chọn lọc (cả vi khuẩn gram [+] lẫn vi khuẩn gram [-] đều mọc được), hay *thạch máu có nalidixic acid (BANg)* để phân lập chọn lọc cầu khuẩn gram [+].
- Hay có thể thêm *thạch máu có gentamicin (BAGe)* để phân lập chọn lọc *S. pneumoniae.*

### 5.2. Phân lập H. influenzae và M. catarrhalis

- Thạch nâu máu ngựa (CAXV) phân lập không chọn lọc H. influenzae và M. catarrhalis.
- Hay có thể dùng *thạch nâu máu ngựa bổ sung Bacitracin (CAHI)* để phân lập chọn lọc các vi khuẩn này.

### 5.3. Phân lập trực khuẩn đường ruột và không đường ruột

- *Thạch Mac Conkey (MC)* dùng phân lập chọn lọc trực khuẩn đường ruột hay không đường ruột.
- Hay có thể dùng các hộp thạch phân lập khác có cùng mục đích.
- Có một số trực khuẩn không đường ruột không mọc trên MC, nhưng trong các trường hợp này, vi khuẩn có thể phân lập được từ thạch máu.

Các hộp thạch máu hay thạch nâu được ủ trong tủ ấm 35-37°C và giữ trong bình nến hay trong tủ $CO_2$. Thạch MC hay loại tương đương thì không cần ủ $CO_2$. Sau khi ủ qua đêm, quan sát các hộp thạch phân lập để tìm các khóm vi khuẩn gây bệnh. Tiến hành định danh và kháng sinh đồ để có thể trả lời kết quả đến lâm sàng vào ngày hôm sau. Các trường hợp không phát hiện được vi khuẩn gây bệnh thì có thể trả lời ngay cho lâm sàng.

## 6. CÁC VI KHUẨN GÂY BỆNH CÓ THỂ TÌM THẤY TRONG MẪU ĐỜM, NTA VÀ BW

Thường khi mẫu tin cậy, vi khuẩn phân lập được trên mặt các hộp thạch phân lập rất phù hợp với kết quả khảo sát trực tiếp qua phết nhuộm gram. Sau đây là các vi khuẩn là tác nhân gây bệnh có thể phân lập từ mẫu.

### 6.1. Thường gặp trong nhiễm trùng cộng đồng

- *H. influenzae*
- *S. pneumoniae*
- *M. catarrhalis*
- *S. aureus*
- *K. pneumoniae*

### 6.2. Thường gặp trong nhiễm trùng bệnh viện

- *S. aureus*
- *P.aeruginosa*
- *K. pneumoniae*
- Các trực khuẩn gram [-] đề mọc khác

Các *Enterobacteriaceae* khác

## 7. CẤY ĐỜM VÀ BỆNH PHẨM CHỨA ĐỜM - CÁC CÂU HỎI THƯỜNG GẶP

### 7.1. Để lấy đờm làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng tìm các vi khuẩn gây nhiễm trùng hô hấp dưới, thời điểm tốt nhất có phải là vào lúc sáng sớm không?

- Lấy đờm vào sáng sớm là lấy đờm để khảo sát tìm vi khuẩn gây bệnh lao và trong xét nghiệm này bệnh nhân lấy đờm vào 3 ngày liên tiếp để gửi đến phòng xét nghiệm lao mỗi ngày. Tại phòng thí nghiệm, mẫu đờm được tiến hành nhuộm kháng acid (acid fast staining) và có thể được làm thuần nhất để cấy vào môi trường cấy lao.
- Để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng phát hiện các vi khuẩn gây nhiễm trùng hô hấp dưới, phải tiến hành lấy đờm ngay sau khi có chẩn đoán và trước khi cho bệnh nhân dùng kháng sinh. Lâm sàng phải hướng dẫn bệnh nhân cách lấy đờm vì nếu không, rất nhiều bệnh nhân không biết cách khạc đờm mà chỉ khạc ra nước bọt và như vậy thì không có giá trị để làm xét nghiệm.

### 7.2. Tại sao có nhiều khi kết quả xét nghiệm vi sinh lâm sàng không phù hợp với hiệu quả điều trị kháng sinh trên bệnh nhân? Ví dụ cấy ra vi khuẩn *P. aeruginosa* kháng rất nhiều kháng sinh trong khi đó chỉ điều trị bệnh nhân bằng Augmentin hay cephalosporin thế hệ 2 bệnh nhân vẫn cải thiện được lâm sàng?

- Đờm là một bệnh phẩm rất có giá trị để từ đó có thể phát hiện được tác nhân vi khẩn gây nhiễm trùng cấp đường hô hấp dưới, nhưng cũng có thể là bệnh phẩm không có giá trị gì nếu như chúng ta không lấy được đờm thật sự mà bệnh phẩm gửi đến phòng thí nghiệm chỉ là nước bọt hay là bệnh phẩm đờm nhưng lại tạp nhiễm quá nhiều nước bọt vùng hầu họng.
- Trường hợp kể trên thường là do bệnh phẩm gửi đến phòng thí nghiệm chỉ là nước bọt hay tạp nhiễm nhiều nước bọt mà phòng thí nghiệm không đánh giá và vẫn tiến hành nuôi cấy. Chính vì vậy vi khuẩn phân lập được không phải là vi khuẩn gây bệnh mà chỉ là vi khuẩn thường trú hay tạm trú trên vùng hầu họng mà thôi.

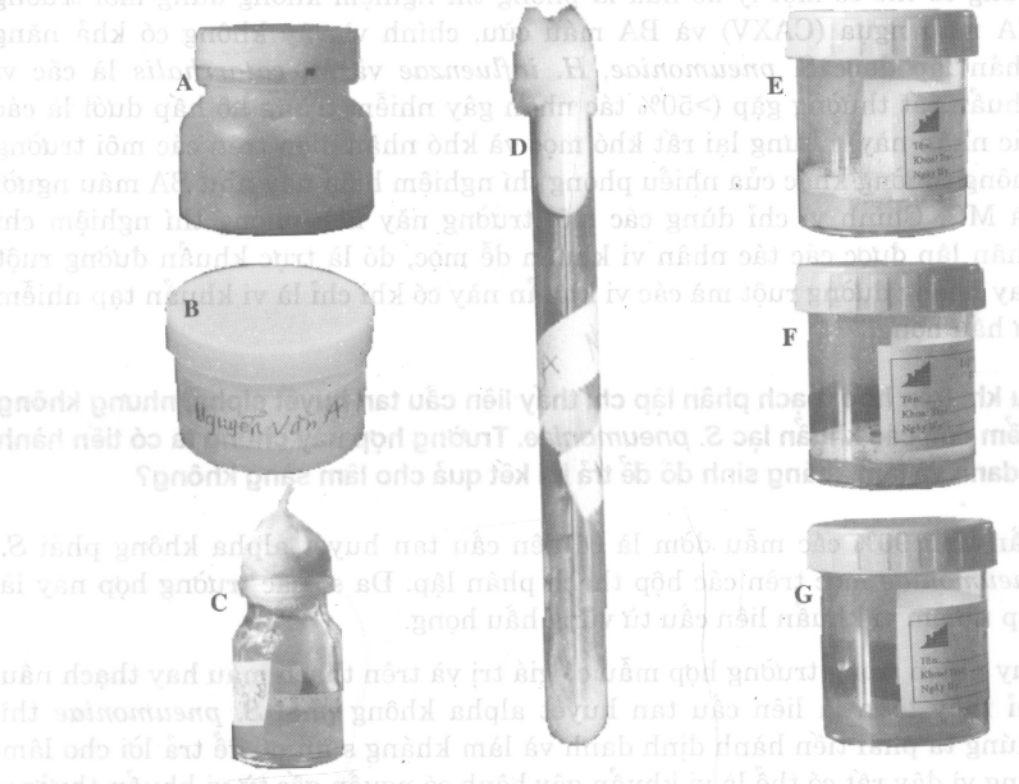
- Cũng có thể có một lý do nữa là phòng thí nghiệm không dùng môi trường CA máu ngựa (CAXV) và BA máu cừu, chính vì vậy không có khả năng phân lập được *S. pneumoniae*, *H. influenzae* và *M. catarrhalis* là các vi khuẩn rất thường gặp (>50% tác nhân gây nhiễm trùng hô hấp dưới là các tác nhân này) nhưng lại rất khó mọc và khó nhận diện trên các môi trường thông thường khác của nhiều phòng thí nghiệm hiện nay như BA máu người và MC. Chính vì chỉ dùng các môi trường này nên phòng thí nghiệm chỉ phân lập được các tác nhân vi khuẩn dễ mọc, đó là trực khuẩn đường ruột hay không đường ruột mà các vi khuẩn này có khi chỉ là vi khuẩn tạp nhiễm từ hầu họng.

**7.3. Nhiều khi trên hộp thạch phân lập chỉ thấy liên cầu tan huyết alpha, nhưng không có đặc điểm của các khuẩn lạc *S. pneumoniae*. Trường hợp này chúng ta có tiến hành tiếp định danh và làm kháng sinh đồ để trả lời kết quả cho lâm sàng không?**

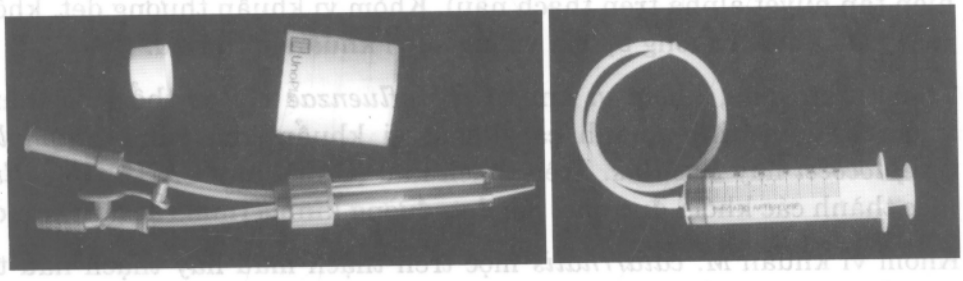
- Gần như 90% các mẫu đờm là có liên cầu tan huyết alpha không phải *S. pneumoniae* mọc trên các hộp thạch phân lập. Đa số các trường hợp này là tạp nhiễm vi khuẩn liên cầu từ vùng hầu họng.
- Tuy nhiên trong trường hợp mẫu có giá trị và trên thạch máu hay thạch nâu chỉ thấy toàn là liên cầu tan huyết alpha không phải *S. pneumoniae* thì chúng ta phải tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ để trả lời cho lâm sàng vì đây rất có thể là vi khuẩn gây bệnh có nguồn gốc từ vi khuẩn thường trú vùng hầu họng nhưng lan xuống đường hô hấp dưới để gây bệnh.

**7.4. Xin cho biết cách nhận dạng các khóm *S. pneumoniae*, *H. influenzae* và *M. catarrhalis*?**

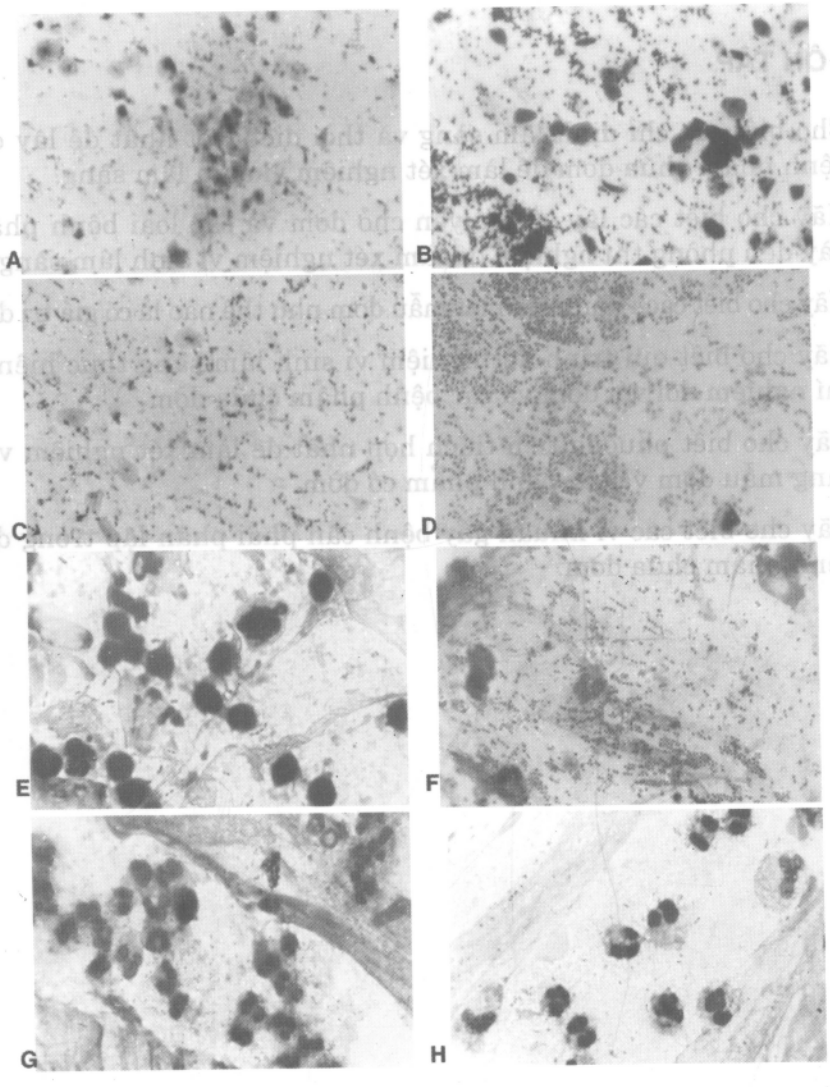
- Khóm vi khuẩn *S. pneumoniae* mọc trên thạch máu cừu cho tan huyết alpha (trên máu người lại cho tan huyết beta nên rất dễ nhầm với liên cầu tan huyết beta), trên thạch nâu cho một vòng màu vàng tươi quanh khóm (biểu hiện tan huyết alpha trên thạch nâu). Khóm vi khuẩn thường dẹt, không lồi, và ở giữa khóm thường bị lõm xuống do vi khuẩn bị tự tiêu.
- Trên thạch máu, khóm vi khuẩn *H. influenzae* chỉ có thể mọc thành các khóm li ti vệ tinh quanh các khóm vi khuẩn khác như *Staphylococci*, *Streptococci* hay *Bacillus*. Trên thạch nâu (CAXV hay CAHI), *H. influenzae* mọc thành các khóm đục nhẹ, hơi dẹt, đường kính #1mm rất dễ nhận diện.
- Khóm vi khuẩn *M. catarrhalis* mọc trên thạch máu hay thạch nâu thường hơi lồi, có màu trắng hay màu vàng, đường kính <1mm. Đặc điểm là khóm bở như bột khoai tây khuấy, có nghĩa là dùng vòng cấy cắt lấy một góc khóm rất dễ dàng. Thử nghiệm oxidase trên khóm cho kết quả [+].




**Hình 8.1:** Một số vật dụng hiện nay vẫn còn dùng tại nhiều bệnh viện để lấy mẫu bệnh phẩm trong đó có mẫu đờm (A,B,C,D), các dụng cụ này rất khó để lấy mẫu vì miệng miệng lọ hay tube rất nhỏ, ngoài ra cũng không an toàn vì bệnh phẩm có thể dính vào nút gòn và rỉ lên miệng lọ hay tube. Với lọ nhựa chuyên dụng nắp vặn, được khử trùng bằng gamma thì khi lấy mẫu như đờm có thể đánh giá ngay là mẫu có giá trị vì chỉ chứa đờm (G) hay ít giá trị vì lẫn nước bọt (F), hay hoàn toàn không giá trị vì chỉ là nước bọt không phải đờm (E). Ngoài ra phương tiện này cũng rất an toàn khi chuyên chở mẫu vì không bị rỉ bệnh phẩm lên nắp.



**Hình 8.2:** Các dụng cụ dùng để lấy mẫu đờm qua ống thông mũi : (A) Bộ lấy đờm qua ống thông mũi (NTS set) bán sẵn trên thị trường. (B) Nếu không có bộ NTS này, có thể dùng xilanh 20 hay 50 ml gắn với ống thông mềm để thay thế




**Hình 8.3:** Kết quả đánh giá mẫu đờm qua phết nhuộm gram quan sát dưới quang trường x100: (A) mẫu không tin cậy vì có >25 tế bào biểu mô và không có tế bào bạch cầu, (B) mẫu bị tạp nhiễm nước bọt vì có > 25 tế bào biểu mô và > 25 bạch cầu (C,D) mẫu hoàn toàn tin cậy vì có <10 tế bào biểu mô và > 25 bạch cầu. Kết quả quan sát mẫu đờm tin cậy qua phết nhuộm gram ở quang trường x 1000: (E) song cầu gram [+] nghi S.pneumoniae, (F) song cầu gram [-] nghi *M.catarrhalis*, (G.H) trực khuẩn gram [-] nhỏ và ngắn nghi *H.influenzae*

## 8. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết các chỉ định lâm sàng và thời điểm tốt nhất để lấy đờm và các bệnh phẩm chứa đờm để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

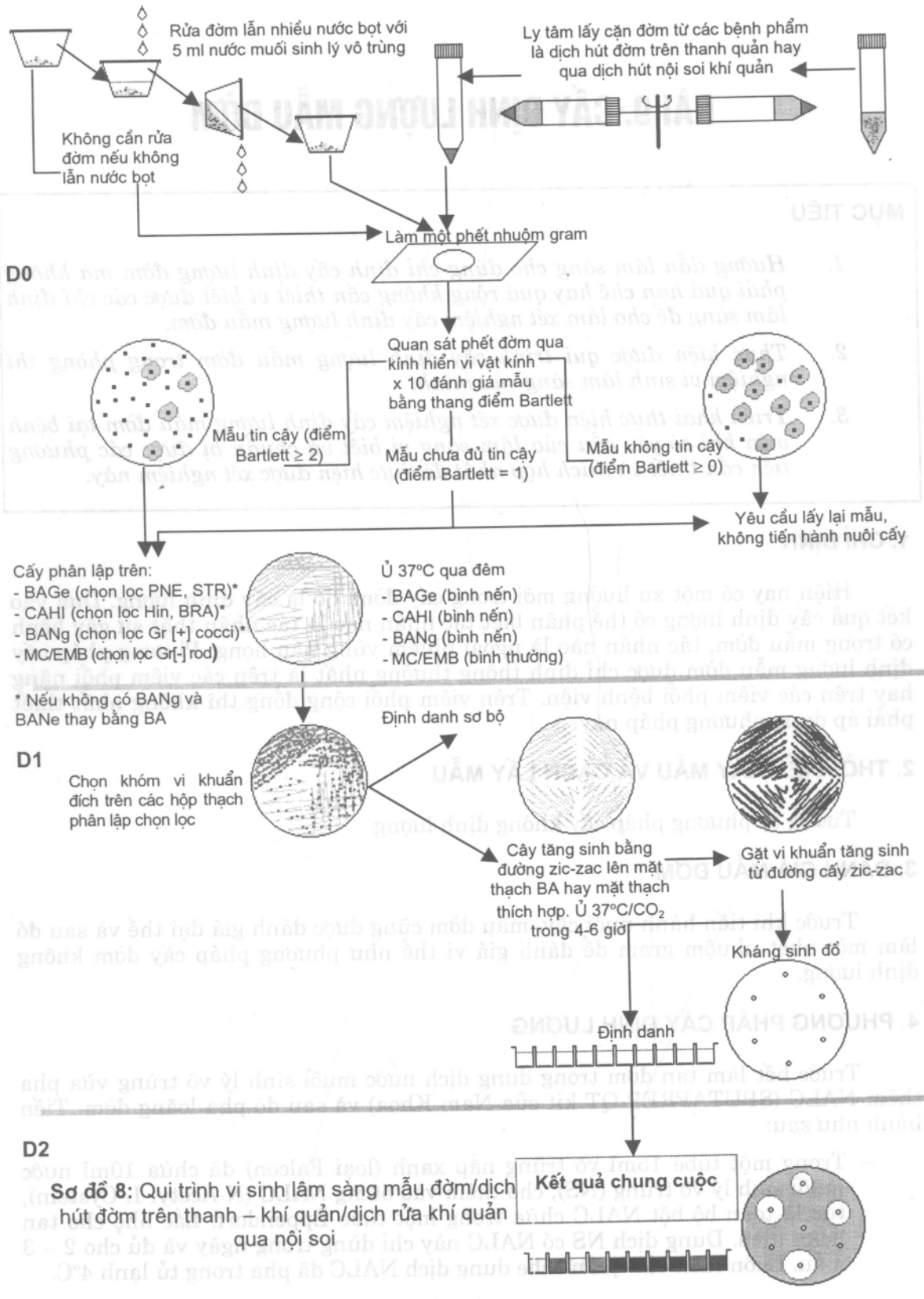
b. Hãy cho biết các lấy và chuyên chở đờm và các loại bệnh phẩm có đờm này đến phòng thí nghiệm để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

c. Hãy cho biết cách đánh giá một mẫu đờm như thế nào là có giá trị để nuôi cấy.

d. Hãy cho biết qui trình xét nghiệm vi sinh lâm sàng thực hiện tại phòng thí nghiệm đối với đờm và các bệnh phẩm chứa đờm.

e. Hãy cho biết phương tiện thích hợp nhất để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng mẫu đờm và các bệnh phẩm có đờm.

f. Hãy cho biết các vi khuẩn gây bệnh cần phải phân lập trong đờm và các bệnh phẩm chứa đờm.




**Sơ đồ 8:** Qui trình vi sinh lâm sàng mẫu đờm/dịch hút đờm trên thanh – khí quản/dịch rửa khí quản qua nội soi

# BÀI 9. CẤY ĐỊNH LƯỢNG MẪU ĐỜM

**MỤC TIÊU**

1. *Hướng dẫn lâm sàng cho đúng chỉ định cấy định lượng đờm mà không phải quá hạn chế hay quá rộng không cần thiết vì biết được các chỉ định lâm sàng để cho làm xét nghiệm cấy định lượng mẫu đờm.*
2. *Thực hiện được qui trình cấy định lượng mẫu đờm trong phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng của mình.*
3. *Triển khai thực hiện được xét nghiệm cấy định lượng mẫu đờm tại bệnh viện khi có yêu cầu của lâm sàng vi biết và chuẩn bị được các phương tiện cần thiết và thích hợp nhất để thực hiện được xét nghiệm này.*

## 1. CHỈ ĐỊNH

Hiện nay có một xu hướng mới trong cấy đờm, đó là cấy định lượng. Dựa vào kết quả cấy định lượng có thể phân biệt tác nhân nào là tác nhân thật sự gây bệnh có trong mẫu đờm, tác nhân nào là ngoại nhiễm vùng hầu họng. Phương pháp cấy định lượng mẫu đờm được chỉ định thông thường nhất là trên các viêm phổi nặng hay trên các viêm phổi bệnh viện. Trên viêm phổi cộng đồng thì không nhất thiết phải áp dụng phương pháp này.

## 2. THỜI ĐIỂM LẤY MẪU VÀ CÁCH LẤY MẪU

Tương tự phương pháp cấy không định lượng

## 3. ĐÁNH GIÁ MẪU ĐỜM

Trước khi tiến hành nuôi cấy, mẫu đờm cũng được đánh giá đại thể và sau đó làm một phết nhuộm gram để đánh giá vi thể như phương pháp cấy đờm không định lượng.

## 4. PHƯƠNG PHÁP CẤY ĐỊNH LƯỢNG

Trước hết làm tan đờm trong dung dịch nước muối sinh lý vô trùng vừa pha thêm NALC (SPUTAPREP-QT kit của Nam Khoa) và sau đó pha loãng đờm. Tiến hành như sau:

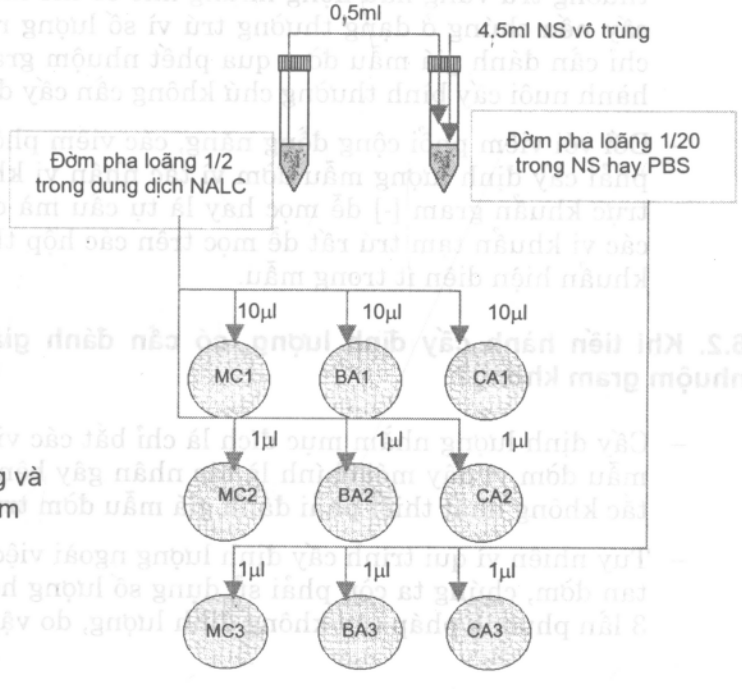
- Trong một tube 15ml vô trùng nắp xanh (loại Falcon) đã chứa 10ml nước muối sinh lý vô trùng (NS), cho thêm vào 50mg NALC (N-Acetyl-L-Cystein), tức là toàn bộ bột NALC chứa trong một tube Eppendorf. Lắc nhẹ cho tan hoàn toàn. Dung dịch NS có NALC này chỉ dùng trong ngày và đủ cho 2 – 3 mẫu. Luôn luôn bảo quản tube dung dịch NALC đã pha trong tủ lạnh 4°C.

– Lấy một thể tích đờm cần nuôi cấy cho vào một tube vô trùng nắp vặn chặt (hay lọ vô trùng nắp đỏ). Thêm vào một thể tích như vậy dung dịch NS có NALC vừa mới pha. Lắc nhẹ cho đến khi đờm tan trong dung dịch này. Như vậy chúng ta đã có đờm đã pha loãng 1/2. Sau khi đờm tan hoàn toàn, pha loãng tiếp mẫu đờm này thành 1/10 trong nước muối sinh lý vô trùng. Như vậy chúng ta đã có đờm pha loãng 1/20.

– Tiến hành cấy định lượng mẫu đờm đã pha loãng 1/2 trên các hộp thạch máu cừu (BA), thạch nâu máu ngựa có bacitracin (CAHI) và thạch MC bằng khuyên cấy định lượng 10µl (0,01ml) và 1µl (0,001ml) hay dùng micropipett để hút 10µl và 1µl cấy lên mặt thạch. Với mẫu đờm pha loãng 1/20, dùng khuyên cấy 1µl hay dùng micropipet để hút 1µl cấy lên mặt thạch và cũng trên 3 loại hộp thạch như trên. Phương pháp cấy định lượng trên mặt thạch được thực hiện như cấy định lượng nước tiểu. Sau khi cấy, các hộp thạch BA và CAHI được ủ trong khí trường $CO_2$ còn các hộp thạch MC được ủ trong khí trường bình thường, nhiệt độ ủ là 35-37°C, thời gian ủ qua đêm hay tối đa 24 giờ. Đọc kết quả và định lượng các loại vi khuẩn mọc trên các hộp thạch như trong bảng 4 trình bày sau:

**Bảng 9.1:** Cách đọc kết quả định lượng các loại vi khuẩn trong mẫu đờm dựa trên số lượng các loại khóm vi khuẩn mọc trên các hộp thạch

| Hộp thạch | Mẫu đờm pha loãng | Vòng cấy định lượng | Thể tích đờm được cấy | Số vi khuẩn được định lượng |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1/2 | 10µl | 5µl | 2N x $10^2$/ml |
| 2 | 1/2 | 1µl | 0,5µl | 2N x $10^3$/ml |
| 3 | 1/20 | 1µl | 0,05µl | 2N x $10^4$/ml |




**Sơ đồ 9:** Cách pha loãng và cấy định lượng mẫu đờm trên các hộp thạch

N là số khóm của một loại vi khuẩn đếm được trên các hộp thạch. Để có con số định lượng của một loại vi khuẩn thì chúng ta nên lấy số trung bình của các kết quả. Ví dụ: ứng với các khóm nghi ngờ *K. pneumoniae*, kết quả trên hộp thạch MC1 là 200 khóm, lượng vi khuẩn K. *pneumoniae* trong 1ml đờm là 40000 CFU/ml ($2x200x10^2$); trên hộp thạch MC2 là 15, lượng vi khuẩn/ml đờm là 30000 CFU/ml ($2x15x10^3$); và trên hộp thạch MC3 là 3, lượng vi khuẩn là 60000 CFU/ml ($2x3x10^3$). Như vậy, kết quả cuối cùng lượng vi khuẩn *K. pneumoniae* trong mẫu đờm sẽ được tính là (40000 + 30000 + 60000)/3 = 43333 CFU/ml. Nếu các hộp thạch 1 và 2 có vi khuẩn quá nhiều (>200 khóm 2), chúng ta chỉ nên đếm số khóm trên hộp thạch 3.

## 5. BIỆN LUẬN KẾT QUẢ

Các vi khuẩn có lượng ≥ 1000 CFU/ml thì phải định danh và làm kháng sinh đồ. Có nghĩa là tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ bất cứ khóm vi khuẩn nào mọc được trên hộp thạch 2 và 3 hay có số lượng ≥ 5 khóm trên hộp thạch 1. Trả lời lâm sàng cả kết quả định lượng là bao nhiêu vi khuẩn đã định danh và làm kháng sinh đồ để lâm sàng có thể tuỳ nghi sử dụng.

## 6. CẤY ĐỊNH LƯỢNG MẪU ĐỜM – CÁC CÂU HỎI THƯỜNG GẶP

### 6.1. Trong trường hợp viêm phổi cộng đồng, có cần thiết phải cấy định lượng mẫu đờm?

- Viêm phổi cộng đồng nếu là nhẹ hay trung bình thì không nhất thiết phải cấy định lượng vì các vi khuẩn gây bệnh thường là *H. influenzae*, *M. catarrhalis* và *S. pneumoniae*. Các vi khuẩn này dù đều có thể là vi khuẩn thường trú vùng hầu họng nhưng khó có thể mọc được trên môi trường nuôi cấy nếu chúng ở dạng thường trú vì số lượng rất ít. Chính vì vậy chúng ta chỉ cần đánh giá mẫu đờm qua phết nhuộm gram, nếu thấy tin cậy thì tiến hành nuôi cấy bình thường chứ không cần cấy định lượng.
- Đối với viêm phổi cộng đồng nặng, các viêm phổi bệnh viện thì rất cần thiết phải cấy định lượng mẫu đờm vì tác nhân vi khuẩn gây bệnh thường là các trực khuẩn gram [-] dễ mọc hay là tụ cầu mà đây là các vi khuẩn có thể là các vi khuẩn tạm trú rất dễ mọc trên các hộp thạch phân lập dù số lượng vi khuẩn hiện diện ít trong mẫu.

### 6.2. Khi tiến hành cấy định lượng, có cần đánh giá mẫu đờm trước qua phết nhuộm gram không?

- Cấy định lượng nhằm mục đích là chỉ bắt các vi khuẩn có số lượng lớn trong mẫu đờm vì đây mới chính là tác nhân gây bệnh thật sự. Do vậy về nguyên tắc không nhất thiết phải đánh giá mẫu đờm trước khi cấy định lượng.
- Tuy nhiên vì qui trình cấy định lượng ngoài việc phải dùng bộ thuốc thử làm tan đờm, chúng ta còn phải sử dụng số lượng hộp thạch phân lập nhiều gấp 3 lần phương pháp cấy không định lượng, do vậy rất cần thiết phải đánh giá

mẫu đờm để chỉ tiếp tục qui trình cấy định lượng khi mẫu đờm được đánh giá là tin cậy hay tin cậy vừa, nhờ vậy chúng ta có thể tiết kiệm vì không phải tiến hành cấy định lượng mẫu không tin cậy.

**6.3. Có khi nào trong kết quả cấy định lượng đờm cho kết quả số lượng vi khuẩn gây bệnh trên 1.000 hay 10000, mà kết quả đánh giá đờm qua phết nhuộm gram quan sát ở quang trường x100 lại không tin cậy không?**

- Trên thực tế có phòng thí nghiệm cấy định lượng đờm cho kết quả như trên. Tuy nhiên với nghiên cứu mà chúng tôi đã tiến hành tại phòng thí nghiệm của mình thì 100% các mẫu không tin cậy đều cho kết quả định lượng với số lượng vi khuẩn (ứng với mỗi loại) <1000 CFU/ml.
- Kết quả này càng khẳng định là không nên cấy định lượng khi phết nhuộm gram mẫu đờm quan sát dưới kính hiển vi với quang trường x100 cho thấy có >10 tế bào biểu mô và <25 tế bào bạch cầu.
- Do vậy, có lẽ phòng thí nghiệm này đã quan niệm sai về cách tính số lượng vi khuẩn, thay vì là số lượng của từng loại vi khuẩn, họ lại tính số lượng của tất cả các loại vi khuẩn hiện diện trong mẫu đờm.

**6.4. Cấy định lượng đờm có khả thi không với điều kiện hiện nay tại các phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng bệnh viện?**

- Trước đây, khó có thể cấy định lượng đờm vì đòi hỏi phải có thuốc thử làm tan đờm phải đặt mua nước ngoài và giá thành khá đắt. Hiện nay bộ thuốc thử làm tan đờm để cấy định lượng đờm đã được công ty Nam Khoa (đạt ISO 9001:2000) nghiên cứu thành công và sản xuất trong nước với sản phẩm mang tên SPUTAPREP -QT. Sản phẩm này rất tiết kiệm và tiện dụng nhờ được chia nhỏ để có thể thực hiện trên tối thiểu 2 mẫu đờm trong ngày.
- Nếu được trang bị SPUTAPREP -QT; và có thêm các loại môi trường phân lập là MC, BA máu cừu, CA giàu XV (các môi trường này cũng đã được công ty Nam Khoa sản xuất dưới dạng chế sẵn hay sẵn sàng để chế); các phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng bệnh viện hoàn toàn có thể cấy định lượng được mẫu đờm mà không gặp bất cứ khó khăn hay trở ngại gì.

**6.5. Khi nào thì nên chỉ định cấy định lượng đờm?**

- Thật ra cấy định lượng đờm có thể chỉ định cho tất cả các trường hợp cấy đờm. Tuy nhiên như đã nói ở trên, cấy định lượng đờm tốn kém gấp 3 lần hơn cấy không định lượng. Do vậy, chúng ta không cần thiết cho cấy định lượng đối với các trường hợp viêm phổi cộng đồng nhẹ và vừa.
- Rất cần thiết phải cho cấy định lượng đờm các trường hợp viêm phổi nặng, các trường hợp viêm phổi bệnh viện, các trường hợp viêm phổi nằm tại các phòng cấp cứu và phòng chăm sóc tăng cường (ICU).

- Cũng nên cho cấy định lượng khi khi quan sát đại thể các mẫu đờm lấy được thấy có lẫn nước bọt.
- Một nguyên tắc mà chúng tôi cho là rất cần thiết phải tuân theo để tiết kiệm chi phí cho bệnh nhân và bệnh viện, đó là không cấy định lượng khi quan sát vi thể mẫu đờm qua phết nhuộm gram cho thấy là mẫu hoàn toàn không tin cậy.

### 7. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết các chỉ định lâm sàng để cấy định lượng mẫu đờm.

b. Có cần đánh giá mẫu đờm trong cấy định lượng không?

c. Nêu cụ thể cách cấy định lượng mẫu đờm như thế nào và vẽ sơ đồ thực hiện.

d. Biện luận một kết quả cấy định lượng đờm.

## PHỤ LỤC

## Sản phẩm liên quan: SPUTAPREP-QT – Bộ thuốc thử làm tan đờm để cấy định lượng đờm

### Nguyên tắc hoạt động

Bộ thuốc thử hoạt động dựa trên nguyên tắc dùng N -Acetyl-L-Cystein (NALC) để làm tan đờm và các nhầy nhớt trong đờm, nhờ vậy làm đồng nhất được mẫu để có thể tiến hành cấy định lượng, tách chiết được nucleic acid của virus hay vi khuẩn gây bệnh có trong đờm để làm thử nghiệm PCR...

### Thành phần thuốc thử

SPUTAPREP-QT dành cho 10 mẫu đờm gồm các thành phần sau:

1. N-Acetyl-L-Cystein (NALC): bột nguyên chất chứa trong 5 tube Eppendorf nhỏ, mỗi tube chứa NALC đủ dùng cho xử lý 2 mẫu đờm.

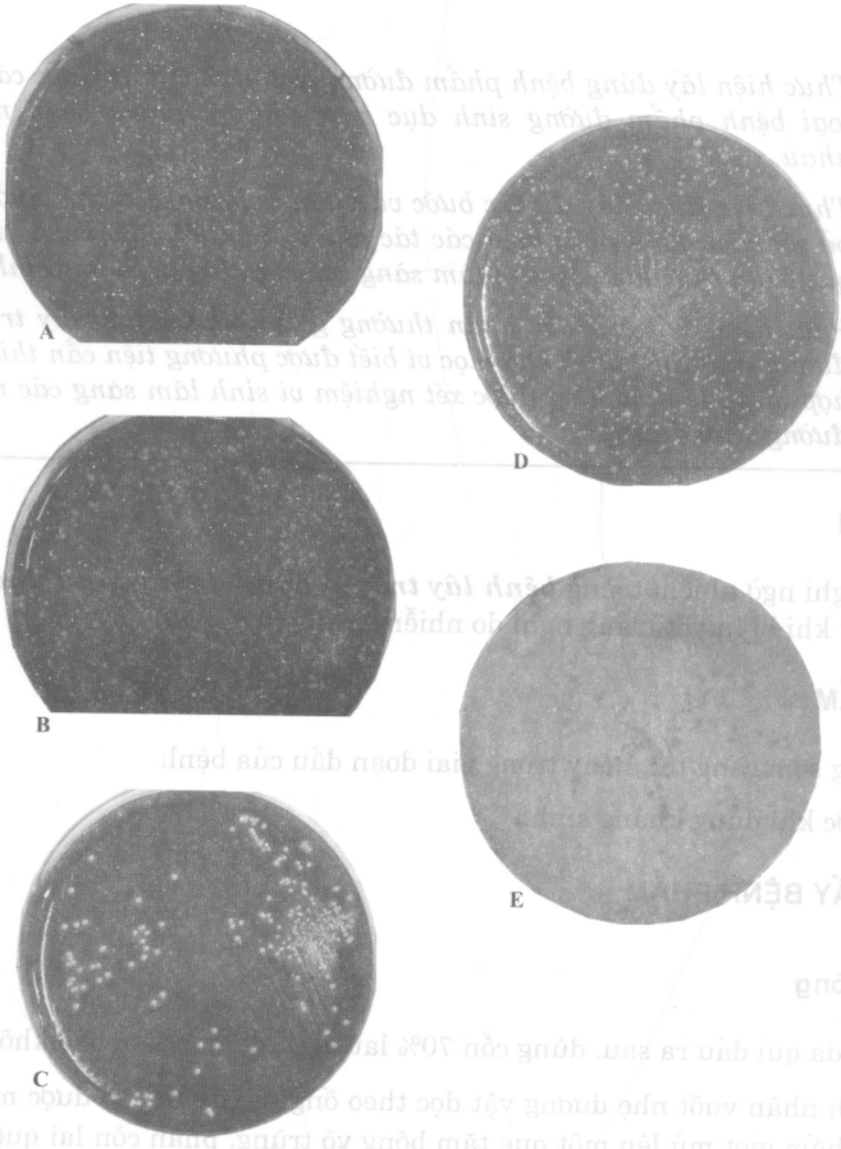
2. Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng: chứa trong tube 15ml nắp vặn chặt, mỗi tube chứa 10ml nước muối sinh lý vô trùng.

Bộ thuốc thử SPUTAPREP -QT chưa dùng hay ngay sau khi dùng nên được giữ trong tủ lạnh 4°C cho đến ngày hết hạn ghi trên hộp (2 năm sau ngày sản xuất).

### Phương pháp làm tan đờm với SPUTEPREP -QT

1. Trong một tube 15ml vô trùng nắp xanh (loại Falcon) đã chứa 10ml nước muối sinh lý vô trùng (NS), cho thêm vào 50mg NALC (N-Acetyl-L-Cystein), tức là toàn bộ bột NALC chứa trong một tube Eppendorf. Lắc nhẹ cho tan hoàn toàn. Dung dịch NS có NALC này chỉ dùng trong ngày và đủ cho 2 – 3 mẫu. Luôn luôn bảo quản tube dung dịch NALC đã pha trong tủ lạnh 4°C.

2. Lấy một thể tích đờm cần nuôi cấy cho vào một tube vô trùng nắp vặn chặt (hay lọ vô trùng nắp đỏ). Thêm vào một thể tích như vậy dung dịch NS có NALC vừa mới pha. Lắc nhẹ cho đến khi đàm tan trong dung dịch này. Như vậy chúng ta đã có đờm đã tan và được pha loãng 1/2. Đờm đã tan này sẵn sàng cho qui trình cấy định lượng hay qui trình tách chiết nucleic acid cho PCR hay RT -PCR để phát hiện các tác nhân vi khuẩn hay virus gây bệnh có trong mẫu đờm.




**Hình 9.1:** Một số hình ảnh cấy định lượng mẫu đờm trên mặt thạch phân lập: (A). Thạch nâu với khóm vi khuẩn nghi ngờ *M.catarrhlis*, (B) Thạch nâu với nhiều khóm vi khuẩn nghi ngờ *S.pneumoniae* có tạp nhiễm vi khuẩn hầu họng khác, (C,D) Thạch máu với nhiêu khóm vi khuẩn nghi ngờ *Streptococus feacalis*, (E) Thạch MC với các khóm vi khuẩn nghi ngờ *Acinetobacter*

# BÀI 10. MẪU BỆNH PHẨM SINH DỤC VÀ CẤY MẪU LẤY TỪ ĐƯỜNG SINH DỤC

**MỤC TIÊU**

1. *Thực hiện lấy đúng bệnh phẩm đường sinh dục vì biết được cách lấy các loại bệnh phẩm đường sinh dục trên các đối tượng bệnh nhân khác nhau.*
2. *Thực hiện được đầy đủ các bước và phân tích được các kết quả để không bỏ sót các cơ hội phát hiện các tác nhân vi khuẩn gây bệnh vì biết được qui trình thực hiện vi sinh lâm sàng các mẫu lấy từ đường sinh dục.*
3. *Phát hiện được các tác nhân thường gây nhiễm trùng lây truyền bằng đường sinh dục dù là khó mọc vì biết được phương tiện cần thiết và thích hợp nhất để thực hiện được xét nghiệm vi sinh lâm sàng các mẫu lấy từ đường sinh dục.*

## 1. CHỈ ĐỊNH

Khi nghi ngờ nhiễm trùng ***bệnh lây truyền bằng đường sinh dục*** (đàn ông, đàn bà) hay khi bị huyết trắng nghi do nhiễm trùng (đàn bà).

## 2. THỜI ĐIỂM

- Càng sớm càng tốt, ngay trong giai đoạn đầu của bệnh.
- Trước khi dùng kháng sinh.

## 3. CÁCH LẤY BỆNH PHẨM

### 3.1. Ở đàn ông

- Tụt da qui đầu ra sau, dùng cồn 70% lau sạch da qui đầu, chờ khô.
- Bệnh nhân vuốt nhẹ dương vật dọc theo ống đái để ra cho được một giọt mủ và thấm giọt mủ lên một que tăm bông vô trùng, phần còn lại quệt trên một lam kính. Que tăm bông được cho vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies (thích hợp nhất là dùng *cặp tube đũa tăm bông vô trùng/tube đũa Stuart Amies*). Gửi ngay đến phòng thí nghiệm để khảo sát càng sớm càng tốt.

- Nếu bệnh nhân không vuốt được mủ, có thể dùng que gòn mảnh luồn vào ống đái sâu khoảng 3-4 cm rồi vừa xoay nhẹ vừa rút ra rồi cho ngay vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies (dùng *cặp tube đũa tăm bông mảnh vô trùng/tube đũa Stuart Amies*).
- Nếu chỉ cần cấy phân lập *N. gonorrhoeae* thì tốt nhất là cấy trên thạch phân lập CATM ngay sau khi lấy bệnh phẩm, cách lấy là dùng vòng cấy nhựa hay vòng cấy kim loại hoặc que gòn mảnh (dùng *tube đũa tăm bông mảnh vô trùng*) luồn vào ống đái sâu khoảng 3-4 cm rồi vừa xoay nhẹ vừa rút ra. Ngay sau đó vạch trên hộp thạch CATM rồi gửi đến phòng thí nghiệm để ủ và theo dõi.
- Các loại bệnh phẩm khác có thể lấy để khảo sát là quệt hậu môn, quệt họng, quệt mủ khi lấy nội soi trực tràng ở người đồng tính luyến ái.

### 3.2. Ở phụ nữ

- 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 vô trùng bằng hấp ướt hay sấy khô chứ không phải bằng hoá chất.
- Dùng tăm bông quệt lấy huyết trắng ở thành sau của âm đạo để khảo sát *T. vaginalis* và nấm (dùng *tăm bông vô trùng lấy mẫu*, hay *tăm bông dài vô trùng lấy mẫu*). Tăm bông này được cho vào một lọ có dung dịch bảo quản F2M (*lọ có F2M để lấy mẫu*) rồi gửi ngay đến phòng thí nghiệm để soi tươi. Nếu muốn cấy vi sinh hay nấm thì lấy quệt huyết trắng bằng que tăm bông rồi cho vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies (dùng *cặp tube đũa tăm bông mảnh vô trùng/tube đũa Stuart Amies*).
- Đối với người bị nghi nhiễm lậu, lấy bệnh phẩm từ lòng cổ tử cung bằng cách dùng gòn vô trùng lau sạch huyết trắng rồi dùng một tăm bông mảnh đưa vào lòng cổ tử cung xoay nhẹ trong 10 giây trước khi rút ra. Lấy mẫu bằng 2 que tăm bông, một que quệt lên một lam kính, que còn lại cho vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies rồi gửi đến phòng thí nghiệm để khảo sát ngay (dùng *cặp tube đũa tăm bông mảnh vô trùng/tube đũa Stuart Amies*).

### 3.3. Ở trẻ con

- Có thể lấy mủ mắt nếu nghi bị viêm mủ kết mạc mắt do lậu.
- Cũng có thể lấy mủ từ âm đạo của bé gái (trường hợp bị hiếp dâm).

### 3.4. 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. Quệt tăm bông này lên một lam lỗ chuyên dùng, để khô tự nhiên

rồi nhỏ lên một giọt aceton hay methanol, chờ khô. Bọc lam bằng một tờ giấy nhôm rồi gửi ngay đến phòng thí nghiệm. Trường hợp chưa gửi đến phòng thí nghiệm được, có thể bảo quản lam trong tủ lạnh 4°C trong tối đa không quá 1 tuần.

- Các vết loét: lau sạch bằng gòn vô trùng rồi nặn chất dịch vào một tăm bông vô trùng, phần còn lại quệt trên một lam kính. Que tăm bông được cho vào một tube nắp chặt vô trùng hay vào môi trường chuyên chở Stuart -Amies (dùng *cặp tube đũa tăm bông vô trùng/tube đũa Stuart Amies*), gửi ngay đến phòng thí nghiệm để khảo sát càng sớm càng tốt.

## 4. KHẢO SÁT TRỰC TIẾP

### 4.1. Bệnh phẩm lấy ở đàn ông hay trẻ con

- Làm phết nhuộm gram, khảo sát dưới kính hiển vi độ phóng đại lớn nhất (vật kính dầu): nếu chỉ có dưới 4-10 bạch cầu trong một quang 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 quang trường và/hay phát hiện có song cầu gram [-] nội tế bào, có thể chắc trên 98% bệnh nhân bị lậu.
- Không làm phết nhuộm gram quệt họng hay quệt hậu môn. Tuy nhiên nếu là quệt mủ lấy từ nội soi trực tràng thì rất có giá trị để khảo sát gram.

### 4.2. Bệnh phẩm lấy ở phụ nữ

- Soi tươi rất cần thiết để phát *hiện Trichomonas vaginalis* và nấm men.
- Làm phết nhuộm gram các quệt bệnh phẩm trên lam kính và quan sát dưới kính hiển vi, vật kính dầu. Với quệt âm đạo: (1) Nếu có ít hơn 5 bạch cầu trong một quang trường và có trực khuẩn gram [+] (thường là *Lactobacillus*), thì đây là một quệt âm đạo bình thường. (2) Nếu có ít hơn 5 bạch cầu trong một quang trường, không có các trực khuẩn gram [+] (*Lactobacillus*), có nhiều trực khuẩn gram [-] nhỏ quanh tế bào kèm các vi khuẩn khác như cầu trực khuẩn gram n [-], trực khuẩn gram [-], trực khuẩn gram [-] cong, thì có nhiều khả năng bệnh nhân bị viêm âm đạo do *Gardnerella vaginalis*. (3) Nếu có trên 10 bạch cầu trong một quang trường, có khả năng bệnh nhân bị nhiễm *C. trachomatis*. Với quệt cổ tử cung: cố phát hiện các song cầu gram [-] nội tế bào. Tuy nhiên kết quả gram không thể chắc bệnh nhân bị lậu vì độ đặc hiệu chỉ đạt 50-90%, độ nhạy chỉ 50-70%.

### 4.3. Trường hợp bệnh phẩm là nước tiểu

Lấy mẫu nước tiểu bằng phương pháp vô trùng 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 thí 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 một phết nhuộm gram, vừa cấy trên môi trường phân lập. Nếu quan sát nhuộm gram có song cầu gram [-] đặc trưng và nội tế bào , có thể trả lời kết quả sơ bộ cho bác sĩ là nghi ngờ lậu cầu.

### 4.4. Trường hợp loét hạ cam

Soi tươi dưới kính hiển vi nền đen hay đảo pha tìm xoắn khuẩn giang mai.

### 4.5. Trường hợp tìm C. trachomatis

Nhuộm kháng thể huỳnh quang rồi đọc dưới kính hiển vi huỳnh quang.

## 5. NUÔI CẤY, PHÂN LẬP

- Trên thạch nâu Thayer Martin (CATM) để cấy phân lập vi khuẩn *N. gonorrhoeae* (vi khuẩn lậu), thêm thạch BANg (có thể thay bằng BA nếu không có BANg) và MC cho các vi khuẩn dễ mọc khác.
- Có thể cấy thêm trên thạch nâu nếu nghi các nhiễm trùng vi khuẩn khó mọc khác.
- Có thể cấy thêm thạch Sabouraud có hay không có kháng sinh nếu có yêu cầu tìm nấm men.
- Các hộp BA và CA phải được ủ 35-37°C trong bình nến. 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.
- Nếu có vi khuẩn mọc, tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ.

## 6. CÁC VI KHUẨN GÂY BỆNH CÓ THỂ TÌM THẤY TRONG ĐƯỜNG SINH DỤC

### 6.1. Thường gặp

- *N. gonorrhoeae,*
- *Treponema pallidum* (soi tươi).

### 6.2. Ít gặp

- *H. ducreyi,*
- *Gardnerella vaginalis* (nhộm gram),

- *Candida albicans* (nhuộm gram),
- *Trichomonas vaginalis* (soi tươi).

### 6.3. Rất hiếm gặp

- *Chlamydia trachomatis*.

## 7. CẤY MẪU BỆNH PHẨM LẤY TỪ ĐƯỜNG SINH DỤC - CÁC CÂU HỎI THƯỜNG GẶP

### 7.1. Một người đàn ông thường hay cảm thấy ngứa rát ở đường tiểu nhưng lại không bị ra mủ tại niệu đạo mà chỉ hay ra chất nhầy trắng trong vào sáng sớm; như vậy họ có bị lậu không và làm thế nào tìm được tác nhân gây bệnh trong trường hợp này?

- Triệu chứng trên có thể là lậu nhưng bệnh nhân đã được điều trị không triệt để trước đó hay là bạn tình (hoặc vợ) của họ không được điều trị triệt để. Tuy nhiên cũng có thể họ nhiễm tác nhân gây bệnh khác không phải lậu như *Trichomonas vaginalis*, *Enterococcus faecalis*, hay *Streptococci* nhóm B. Do vậy, trước hết phải hỏi kỹ bệnh sử của bệnh nhân xem trước đây có triệu chứng của lậu không, có điều trị không? điều trị như thế nào? có điều trị cả cho bạn tình không?...
- Trong trường hợp này cách lấy bệnh phẩm tốt nhất là dùng một tăm bông mảnh hay một vòng cấy nhựa nhỏ luồn vào niệu đạo qua đầu dương vật để ngoáy nhẹ và lấy chất nhầy ra lấy lên hộp thạch CATM và hộp thạch CA. Các hộp thạch này phải được chuyển đến phòng thí nghiệm để ủ ngay trong tủ ấm và bình nến hay tủ ấm $CO_2$. Ngoài ra cũng phải lấy thêm bệnh phẩm với cách như trên để soi tươi và làm một phết nhuộm gram để khảo sát trực tiếp nữa.

### 7.2. Một số phòng thí nghiệm hay làm xét nghiệm khảo sát trực tiếp cặn lắng nước tiểu để tìm vi khuẩn lậu. Xét nghiệm này có tin cậy không?

- Nếu muốn tìm vi khuẩn lậu trong nước tiểu thì nhất thiết phải khảo sát cặn lắng nước tiểu với nước tiểu lấy đầu dòng hay cuối dòng vào sáng sớm. Tuy nhiên nếu chỉ dựa vào phết nhuộm gram thì khó có thể kết luận chính xác lậu dù có thể thấy được hình ảnh điển hình song cầu gram [-] nội tế bào, mà phải nuôi cấy cặn lắng trên môi trường CATM.
- Tuy nhiên vi khuẩn lậu trong nước tiểu có thể khó nuôi cấy thành công, do vậy hiện nay một kỹ thuật chính xác và nhạy cảm nhất là người ta tiến hành thử nghiệm PCR phát hiện *N. gonorrhoeae* đồng thời với *C. trachomatis* trong cặn lắng nước tiểu.

**7.3. Hiện nay có thử nghiệm xét nghiệm nhanh tìm *N. gonorrhoeae* và *C. trachomatis*. Thử nghiệm này hoạt động trên nguyên tắc nào và có đáng tin cậy không?**

- Các thử nghiệm như vậy đa số đều dựa trên nguyên tắc thử nghiệm sắc ký miễn dịch (xem trang 45) phát hiện kháng nguyên vi sinh vật có trong bệnh phẩm.
- Vì là thử nghiệm phát hiện kháng nguyên nên giá trị hơn là thử nghiệm phát hiện kháng thể. Tuy nhiên độ nhạy cảm và độ đặc hiệu cao hay không thì lại rất thay đổi tuỳ theo hãng sản xuất. Do vậy trước khi áp dụng chúng ta phải nghiên cứu so sánh với phương pháp nuôi cấy (đối với vi khuẩn *N. gonorrhoeae*), hay phương pháp miễn dịch huỳnh quang trực tiếp (đối với *C. trachomatis*), hay nếu có điều kiện thì so với phương pháp PCR. Tuy nhiên đối với các hãng sản xuất mà sản phẩm này đã được FDA đánh giá chấp nhận lưu hành thì chúng ta có thể sử dụng ngay mà không cần phải nghiên cứu.

**7.4. Kết quả nhuộm Gram một phết âm đạo hay cổ tử cung thấy có song cầu Gram [-], nội tế bào. Có thể nghi ngờ bệnh nhân nhiễm N. *gonorrhoeae* không?**

- Nếu là một quệt mủ niệu đạo ở đàn ông và kết quả như vậy thì có thể khẳng định chẩn đoán bệnh nhân bị lậu. Nhưng trong trường hợp bệnh phẩm là quệt âm đạo hay cổ tử cung của phụ nữ thì chỉ có thể nghi ngờ chứ không thể chắc chắn, cần phải nuôi cấy.
- Để nuôi cấy, cần phải cấy ngay quệt này lên hộp thạch Thayer Martin (CATM) có các kháng sinh ức chế vi khuẩn và nấm và ủ ngay trong bình nến hay tủ ủ $CO_2$ 5%. Sau khi phân lập, các khóm nghi ngờ phải được định danh xác định *N. gonorrhoeae* bằng phương pháp lên men đường nhanh (3 loại đường: glucose, lactose, maltose, và sucrose). Vi khuẩn *N. gonorrhoeae* chỉ lên men đường glucose, không lên men các đường khác.

**7.5. Xin cho biết giá trị của thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang phát hiện *C. trachomatis* trong các bệnh phẩm là các mẫu quệt cổ tử cung**

- Đây là thử nghiệm phát hiện trực tiếp vi khuẩn *C. trachomatis* bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trực tiếp dùng kháng thể đặc hiệu *C. trachomatis* gắn huỳnh quang. Nếu làm đúng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất thì thử nghiệm rất đáng tin cậy.
- Một khó khăn khi thực hiện thử nghiệm này là nên dùng dụng cụ lấy mẫu thích hợp đó là những bàn chải quệt lấy cổ tử cung mà hiện nay nếu phải đặt mua tại Việt Nam thì giá thành khá đắt.

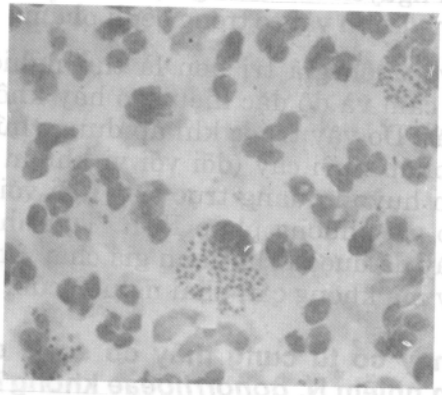
## 8. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết các cách lấy bệnh phẩm từ đường sinh dục ở các đối tượng khác nhau.

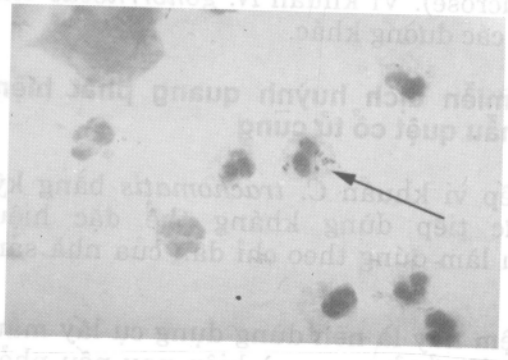
b. Hãy cho biết các phương pháp khảo sát trực tiếp và các cách đánh giá kết quả khảo sát trực tiếp trên các bệnh phẩm lấy từ đường sinh dục.

c. Hãy mô tả qui trình nuôi cấy và phân lập các vi khuẩn gây bệnh từ các bệnh phẩm lấy từ đường sinh dục và từ đó cho biết các phương tiện cần thiết để thực hiện được qui trình này.

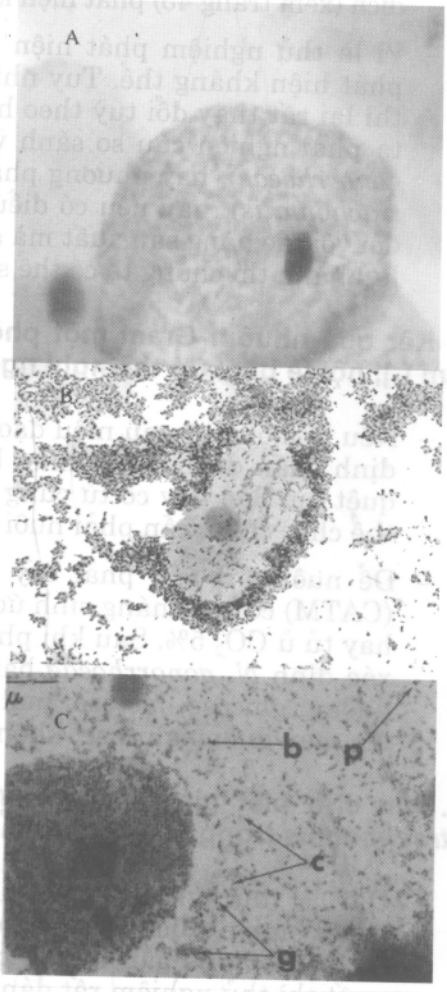
d. Hãy cho biết các vi khuẩn gây bệnh có thể tìm thấy từ đường sinh dục.



**Hình 10.1:** Phết nhuộm gram một mẫu mủ niệu đạo của một người đàn ông nghi bị lậu. Quan sát ở quang khuẩn x1000. Có nhiều tế bào bạch cầu đã nhân có các song cầu gram [-] nội tế bào. Với kết quả này có thể chẩn đoán gần như 100% bệnh nhân bị lậu. Tuy nhiên cũng cần phải tiến hành nuôi cấy để làm kháng sinh đồ

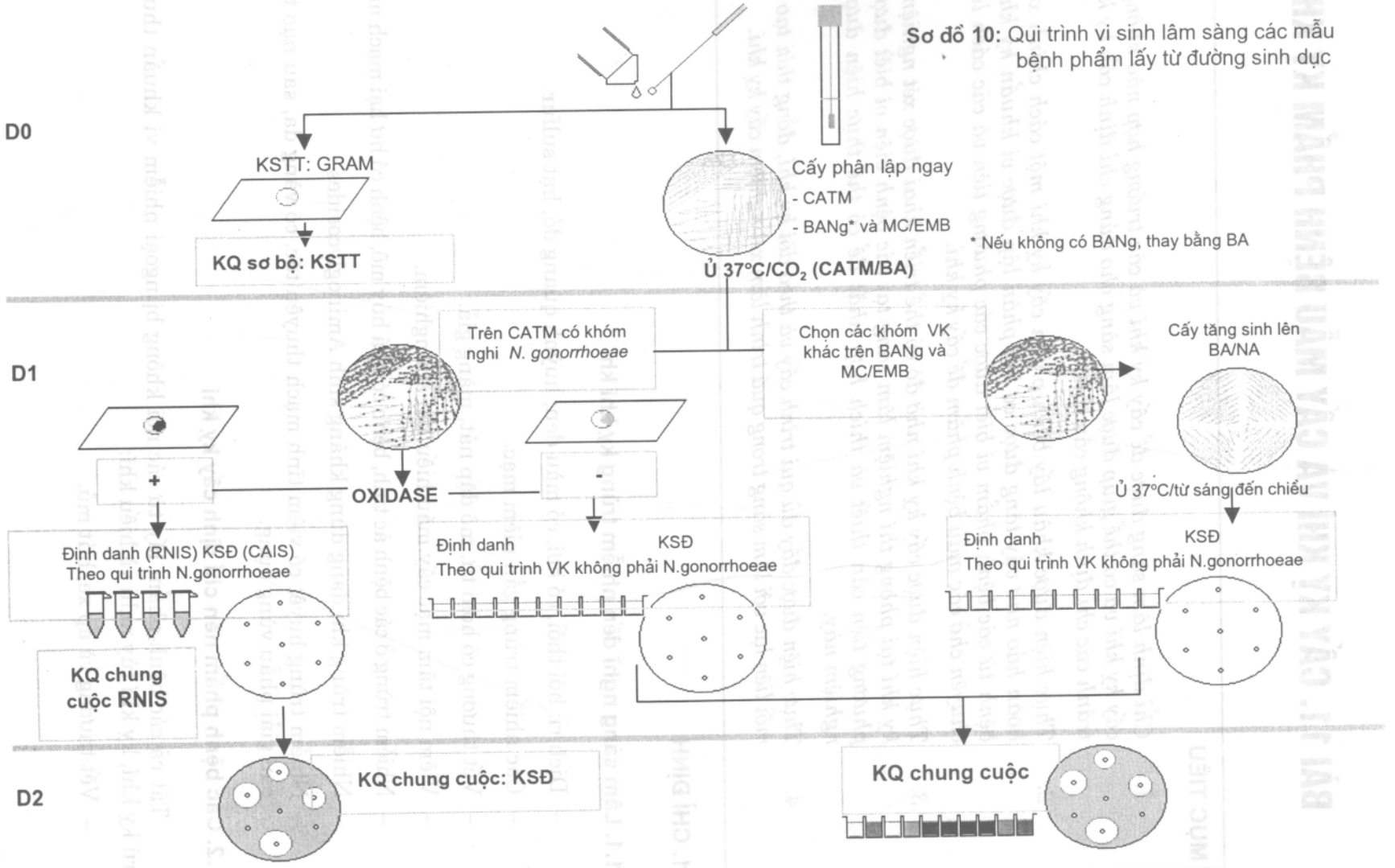


**Hình 10.2:** Phết nhuộm gram một mẫu cặn lắng nước tiểu của một người đàn ông nghi bị lậu cho thấy có một số tế bào bạch cầu đa nhân có các song cầu gram [-] nội tế bào. Kết quả này có thể giúp chẩn đoán bệnh nhân bị lậu, tuy nhiên cần xác định bằng nuôi cấy




**Hình 10.3:** Hình ảnh vi thể một phết tế bào âm đạo bệnh nhân nhiễm *Gardnerella vaginalis*. (A) phết soi tươi chỉ thấy trực khuẩn cong bàm đầy lên tế bào chất tế bào biểu mô âm đạo. (B) phết nhuộm gram cũng cho thấy trực khuẩn *G.vaginalis* bám đầy lên tế bào biểu mô âm đạo. (C) Cũng phết nhuộm gram quệt âm đạo, ngoài *G.vaginalis* (g), chúng ta còn thấy các vi khuẩn khác như *Bacteroides (b) – Mobilincus (c) – Peptostreptococci (p)*

**Sơ đồ 10:** Qui trình vi sinh lâm sàng các mẫu bệnh phẩm lấy từ đường sinh dục



# BÀI 11. CẤY KỴ KHÍ VÀ CẤY MẪU BỆNH PHẨM KỴ KHÍ

**MỤC TIÊU**

1. *Chỉ định lâm sàng được để cấy kỵ khí và các trường hợp nào không nên cấy kỵ khí và có thể giúp được lâm sàng cho đúng chỉ định cấy kỵ khí và tránh các chỉ định không cần thiết.*
2. *Thực hiện được khâu lấy bệnh phẩm cấy kỵ khí một cách chính xác và hoàn hảo nhờ vậy tăng được cơ hội phân lập được vi khuẩn kỵ khí gây bệnh từ các bệnh phẩm vì biết được các phương tiện và các cách lấy và chuyên chở các mẫu bệnh phẩm để cấy kỵ khí.*
3. *Thực hiện được cấy kỵ khí nhờ đó có thể triển khai được xét nghiệm cấy kỵ khí tại phòng thí nghiệm lâm sàng tại các bệnh viện vì biết được các phương tiện cần thiết và thích hợp nhất để có thể thực hiện được xét nghiệm này.*
4. *Thực hiện được đầy đủ qui trình cấy và theo dõi kỵ khí, đồng thời tạo được mối liên lạc với lâm sàng trong quá trình làm xét nghiệm cấy kỵ khí.*

## 1. CHỈ ĐỊNH

### 1.1. Lâm sàng nghĩ đến nhiễm trùng kỵ khí khi

- Dịch rỉ: hôi thối, có hơi, có màu đen; huỳnh quang đỏ, hạt sulfur.
- Các nhiễm trùng gần niêm mạc.
- Vết thương có hoại tử, mô dập nát, màng giả.
- Viêm nội tâm mạc cấy máu hiếu khí âm nghiệm.
- Nhiễm trùng ở các bệnh ác tính, bệnh có phá hủy mô, bệnh có hư hại mạch máu.
- Nhiễm trùng khi đang dùng kháng sinh Aminoglycosides.
- Nhiễm trùng huyết có viêm tĩnh mạch thuyên tắc, có vàng da, sau nạo thai, sau giải phẫu vùng bụng.

### 1.2. Các bệnh phẩm nên chỉ định cấy kỵ khí

Tất cả các bệnh phẩm lấy từ các nơi không bị ngoại nhiễm vi khuẩn thường trú kỵ khí, kỵ khí tùy nghi và hiếu khí:

- Vết thương và áp xe, hút mủ.

- Mô (sinh thiết, tử thiết, phẫu thuật).
- Các dịch cơ thể (DNT, màng phổi, màng bụng, màng tim, dịch khớp).
- Máu, tủy xương.
- Dịch hút khí quản qua da.
- Dịch chọc hút phổi (cũng như các dịch chọc hút từ các nơi khác của cơ thể).
- Các hạt lưu huỳnh lấy từ bệnh nhân nghi nhiễm *Actinomyces*.
- Nước tiểu (chọc hút qua da trên xương mu, lỗ mở niệu quản, thẩm tích, niệu quản, phẫu thuật mở bàng quang hay mở thận).
- Niệu dục (chỉ lấy từ các nơi không có vi khuẩn kỵ khí thường trú).
- Ruột non (blind loop và các hội chứng kém hấp thu tương tự).
- Phân hay bệnh phẩm từ dạ dày ruột (để phát hiện độc tố và cấy phát hiện các vi khuẩn nghi ngờ gây bệnh như *Clostridium difficile*, *C. perfringens* và *C. botulinum*).

### 1.3. Các bệnh phẩm không nên chỉ định cấy kỵ khí

Do không thể phân biệt được tác nhân gây bệnh và vi khuẩn thường trú như:

- Quệt họng hay mũi hầu, quệt nướu răng.
- Đờm, dịch hút nội soi phế quản không lấy bằng ống thông có hai nòng và có bảo vệ.
- Các dịch dạ dày và ruột non (trừ trường hợp blind loop và các hội chứng tương tự), phân (trừ trường hợp tìm độc tố và phát hiện các *clostridia* gây bệnh), quệt hậu môn, mạch lươn từ ruột già ra da và thông nối ruột già dạ dày (colostomy stomata).
- Các bệnh phẩm lấy từ bề mặt các vết loét do nằm lâu, các quệt từ các bề mặt khác, đường dẫn từ xoang (sinus tract) và các hoại tử (eschar).
- Bệnh phẩm lấy gần da và niêm mạc bằng các phương pháp không thích hợp, dễ bị ngoại nhiễm.
- Nước tiểu (voided urin), quệt âm đạo hay cổ tử cung.

## 2. CÁC PHƯƠNG PHÁP LẤY BỆNH PHẨM ĐỂ CẤY KỴ KHÍ

- Tốt nhất là bệnh phẩm sau khi lấy phải được cho ngay vào trong môi trường chuyên chở chuyên dùng như Carryport (dùng cặp tube đũa tăm bông vô trùng/tube đũa Carryport).
- Bệnh phẩm có thể được lấy bằng tăm bông vô trùng đưa sâu vào trong môi trường chuyên chở. Hay sau khi cho vào môi trường chuyên chở thì dùng tăm bông vô trùng đẩy sâu vào bên trong môi trường.

- Các bệnh phẩm khác như DNT, chất dịch, sau khi hút vào ống kim, đậy chặt nắp kim lại và gửi nguyên đến PTN.

## 3. QUI TRÌNH VI SINH LÂM SÀNG KHẢO SÁT MẪU KỴ KHÍ

** NGÀY 1:*

### 3.1. Mẫu được lấy vào môi trường chuyên chở kỵ khí

Đó là Carryport (Nam Khoa); trường hợp dịch hay mủ, có thể hút bằng ống chích insulin không cho bọt khí lẫn vào rồi mang thẳng đến PTN.

### 3.2. Phòng thí nghiệm phải tiến hành khảo sát ngay theo các bước sau

Cấy vào các môi trường phân lập kỵ khí và /hay hiếu khí:

- Cấy hiếu khí: BA hay BANg, EMB hay MC. BA ủ trong bình nến, MC hay EMB ở khí trường bình thường. Theo dõi theo qui trình các mẫu bệnh phẩm cấy hiếu khí.
- Cấy kỵ khí: BA kỵ khí (BAYK) và BAYK có phenyl Ethyl Alcohol (BAYK-PEA) hay BAYK có nalidixic acid (BANg). Ủ trong bình hay túi kỵ khí (ví dụ: Genbox của bio -Mérieux) và khí trường kỵ khí được tạo ra bằng phương pháp hoá học (ví dụ: bao Genbox anaer của bio -Mérieux không cần dùng xúc tác hay bao Gaspak của BD với xúc tác Pallidium -aluminium). Bình ủ kỵ khí được giữ trong tủ ấm $37^0$C trong 48 giờ.
- Làm phết nhuộm gram bệnh phẩm, ghi nhận sự hiện diện của các vi khuẩn trong mẫu trước khi có kết quả cấy. Trả lời kết quả sơ bộ cho bác sĩ điều trị qua điện thoại hay qua phiếu trả lời kết quả tạm thời.

** NGÀY 3:* (vì phải ủ bình kỵ khí trên 48 giờ)

- Mở bình kỵ khí hay túi kỵ khí. Quan sát các mặt thạch, ghi nhận các loại khóm và hình thái các khóm. Làm phết nhuộm gram khảo sát dưới kính hiển vi.
- Thực hiện cấy lại thuần khiết các khóm trong môi trường BAYK/ủ kỵ khí, đồng thời làm thử nghiệm loại trừ vi khuẩn phân lập được là YK tùy nghi, HK tuyệt đối bằng cách cấy thêm trên mặt thạch BA /ủ bình nến.
- Trả lời thêm kết quả sơ bộ cho lâm sàng.

** NGÀY 4 HAY 5:*

- Quan sát BA /ủ bình nến. Nếu không có vi khuẩn mọc thì vi khuẩn phân lập được là YK tuyệt đối.
- Mở bình kỵ khí. Lấy các khóm vi trùng trên thạch BAYK đã xác định là kỵ khí tuyệt đối. Làm phết nhuộm gram quan sát hình dáng vi khuẩn qua kính hiển vi.

- Tiến hành qui trình định danh với API 20A và làm kháng sinh đồ với ATB - ANA, ủ kỵ khí 24-36 giờ. Nếu không có API 20A thì có thể tiến hành định danh kỵ khí theo qui trình kinh điển với một số môi trường và phản ứng sinh hoá đặc biệt.
- Trả lời kết quả chung cuộc cho lâm sàng sau khi đọc kết quả định danh và kháng sinh đồ.

## 4. CÁC PHƯƠNG PHÁP TẠO KHÍ TRƯỜNG KHÔNG CÓ $O_2$ (OXY PHÂN TỬ) ĐỂ CẤY KỴ KHÍ

### 4.1. Phương pháp dùng bao sinh khí $CO_2$ và khử khí $O_2$ trong bình ủ hay trong bao ủ

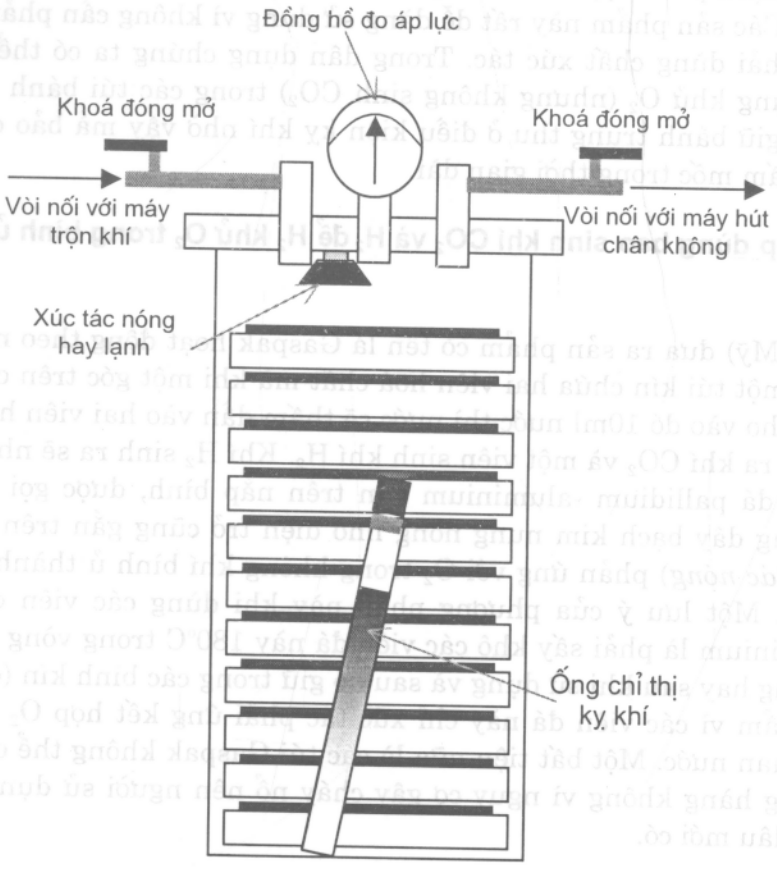
Phương pháp này dùng một túi kín chứa một bao hoá chất mà khi túi kín này bị xé ra để bao hoá chất tiếp xúc với không khí thì sẽ xảy ra phản ứng hoá học khử $O_2$ trong không khí và sinh ra khí $CO_2$ với tỷ lệ 5% trong bình ủ hay túi ủ tương ứng với khả năng khử $O_2$ của bao hoá chất. Hãng bio -Mérieux có đưa ra thị trường sản phẩm có công dụng như trên và có tên là Genbox -anaer dùng cho bình ủ cho khoảng 10 hộp thạch phân lập và Genbag -anaer dành cho túi ủ cho khoảng 2 hộp thạch phân lập. Các sản phẩm này rất dễ dàng sử dụng vì không cần phải cho nước vào túi hay là phải dùng chất xúc tác. Trong dân dụng chúng ta có thể thấy sản phẩm có công dụng khử $O_2$ (nhưng không sinh $CO_2$) trong các túi bánh trung thu nhằm mục đích giữ bánh trung thu ở điều kiện kỵ khí nhờ vậy mà bảo quản được bánh không bị nấm mốc trong thời gian dài.

### 4.2. Phương pháp dùng bao sinh khí $CO_2$ và $H_2$ để $H_2$ khử $O_2$ trong bình ủ nhờ chất xúc tác

Hãng BD (Mỹ) đưa ra sản phẩm có tên là Gaspak hoạt động theo nguyên tắc này. Gaspak là một túi kín chứa hai viên hoá chất mà khi một góc trên của túi kín này bị xé ra và cho vào đó 10ml nước thì nước sẽ thấm dần vào hai viên hoá chất để có một viên sinh ra khí $CO_2$ và một viên sinh khí $H_2$. Khí $H_2$ sinh ra sẽ nhờ chất xúc tác (là các viên đá pallidium -aluminium gắn trên nắp bình, được gọi là *xúc tác lạnh*; hay là vòng dây bạch kim nung nóng nhờ điện trở cũng gắn trên nắp bình, được gọi là *xúc tác nóng*) phản ứng với $O_2$ trong không khí bình ủ thành $H_2O$ bám vào thành bình. Một lưu ý của phương pháp này khi dùng các viên đá xúc tác pallidium -aluminium là phải sấy khô các viên đá này 180°C trong vòng 1 giờ ngay trước khi sử dụng hay sau khi sử dụng và sau đó giữ trong các bình kín (dessicator) có silicagel hút ẩm vì các viên đá này chỉ xúc tác phải ứng kết hợp $O_2$ với $H_2$ khi chúng ở dạng khan nước. Một bất tiện nữa là các túi Gaspak không thể chuyên chở được bằng đường hàng không vì nguy cơ gây cháy nổ nên người sử dụng phải đặt hàng trước khá lâu mới có.

### 4.3. Phương pháp dùng bình khí $CO_2$ và bình khí $H_2$ phối trộn lại để thay không khí trong bình ủ, sau đó chất xúc tác sẽ kết hợp $H_2$ với $O_2$ để khử hoàn toàn $O_2$ trong bình ủ

Phương pháp này rẻ tiền nhất nhưng muốn áp dụng thì phải trang bị cho đầy đủ các bình cung cấp $H_2$ và $O_2$, máy trộn khí để trộn $H_2$ và $CO_2$ từ hai bình cấp khí và bơm chân không nối với bình ủ. Sau khi cho các hộp thạch đã cấy bệnh phẩm vào trong bình ủ, phải thực hiện qui trình thay không khí trong hình ủ bằng hỗn hợp khí như sau: (1) Đậy chặt bình ủ rồi nối vòi cấp khí và vòi hút chân không vào bình qua nắp bình, đóng khoá vòi cấp khí và mở khoá vòi hút rồi bật máy hút chân không để hút không khí ra khỏi bình cho đến áp lực đạt $<10^{-2}$ thì khoá vòi. (2) Mở khoá vòi cấp khí để cung cấp hỗn hợp khí vào bình ủ cho đến khi áp lực khí trong bình trở lại bình thường thì đóng vòi cấp khí. (3) Tiếp tục lại qui trình này thêm vài lần nữa để đảm bảo không khí trong bình đã được thay hoàn toàn bằng hỗn hợp khí. Hỗn hợp khí này vẫn có thể còn $O_2$ vì khó có thể có được các bình cấp khí $CO_2$ và bình cấp khí $H_2$ không bị tạp nhiễm $O_2$, tuy nhiên sau vài giờ khí $O_2$ trong hỗn hợp khí trong bình sẽ bị khử hoàn toàn nhờ các xúc tác nóng hay xúc tác lạnh gắn ở nắp bình. Cũng như phương pháp dùng bao Gaspak, nếu chúng ta dùng xúc tác lạnh thì phải khử nước xúc tác lạnh bằng cách sấy 180°C trong hơn một giờ để đảm bảo xúc tác hoạt động tốt.



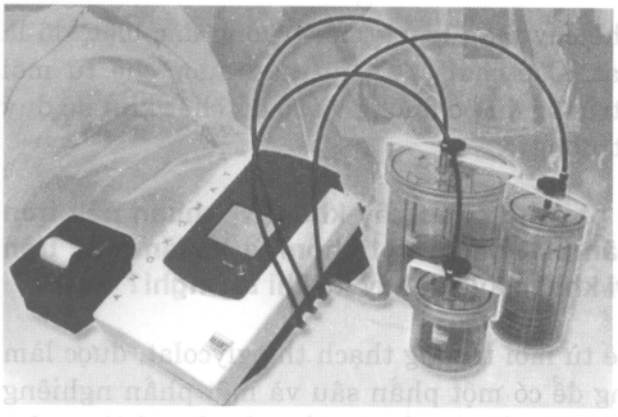

**Hình 11.1:** Cấu trúc một bình ủ kỵ khí dùng phương pháp thay khí

Hiện nay có máy trộn khí thực hiện việc hút chân không của bình và cho khí vào bình một cách hoàn toàn tự động, ví dụ máy Anoxomat mark II của Hà Lan (*Hình 11.2*) và nhờ vậy người làm xét nghiệm không cần phải thực hiện các động tác mở, đóng van xả và hút khí nữa.

## 5. CHỈ THỊ KỴ KHÍ

Chỉ thị kỵ khí là một phương tiện giúp chúng ta có thể kiểm tra được là trong bình kỵ khí thật sự đã hoàn toàn hết $O_2$ chưa. Các chỉ thị kỵ khí thường hoạt động dựa trên nguyên tắc khử màu của một chất màu khi chất màu này ở dạng khử và có màu khi ở dạng oxid hoá. Các chất màu có đặc tính như vậy là Methylen blue và Resazurin và đây cũng là hai chất thường được cho vào môi trường Thioglycolat hay môi trường chuyên chở bệnh phẩm để cấy kỵ khí cũng với mục đích cho biết các môi trường này có ở tình trạng khử $O_2$ trong phần sâu dưới bề mặt của môi trường hay không để sẵn sàng sử dụng. Nếu ở phần sâu của ống môi trường có màu thì người ta phải đun cách thuỷ chúng để đuổi hết $O_2$ (khi đó phần sâu của môi trường sẽ mất màu) và để nguội rồi mới sử dụng.

Chúng ta có thể tự pha chỉ thị màu để kiểm tra tình trạng kỵ khí của bình ủ, nhưng đơn giản nhất là chúng ta có thể dùng một ống môi trường chuyên chở kỵ khí hay một ống môi trường thioglycollat để làm chỉ thị kỵ khí. Cách sử dụng là trước hết phải đun cách thuỷ các ống môi trường này để đuổi hết $O_2$ khỏi môi trường và sau đó để nguội, lúc này phần mặt ống môi trường sẽ có màu trở lại. Nới lỏng nắp ống môi trường và cho vào bình ủ kỵ khí trước khi đậy nắp. Bình ủ kỵ khí được coi là kỵ khí hoàn toàn khi bề mặt các ống môi trường này mất màu hoàn toàn sau khi tiến hành ủ kỵ khí khoảng 1-2 giờ.



**Hình 11.2:** Máy axonomat Mark II của Hà Lan để tạo khí trường kỵ khí

## 6. CẤY MẪU BỆNH PHẨM KỴ KHÍ - CÁC CÂU HỎI THƯỜNG GẶP

### 6.1. Một số bác sĩ lâm sàng muốn tìm tác nhân vi khuẩn kỵ khí gây viêm phổi. Yêu cầu này có hợp lý không và phòng thí nghiệm có nên đáp ứng yêu cầu này không?

– Thực tế có một số bác sĩ có yêu cầu này, tuy nhiên như đã trình bày là cấy kỵ khí không nên thực hiện trên các bệnh phẩm đờm hay dịch rửa khí quản

vì đây là các mẫu thử tạp nhiễm, không thể phân biệt được vi khẩn kỵ khí gây bệnh với vi khuẩn kỵ khí tạp nhiễm. Do vậy, nếu muốn tìm tác nhân vi khuẩn kỵ khí gây viêm phổi thì phải có phương tiện lấy được bệnh phẩm là đờm lấy qua nội soi bằng ống thông có hai nòng và có bảo vệ.

- Tuy nhiên cũng cần phải biết rằng tác nhân gây viêm phổi cộng đồng rất hiếm khi là vi khuẩn kỵ khí, mà thường là *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, và *M. catarrhalis*.... Tác nhân gây viêm phổi bệnh viện cũng vậy, thường là *S. aureus*, các trực khuẩn gram [-] đường ruột hay không lên men. Do vậy theo chúng tôi nghĩ yêu cầu tìm vi khuẩn kỵ khí gây viêm phổi là không hợp lý lắm. Chỉ nên nghĩ đến tác nhân vi khuẩn kỵ khí trong các trường hợp viêm phổi tắc nghẽn ủ (do hít dị vật hay do đờm quá đặc và nhiều bít lấy khí quản trong các trường hợp COPD nặng), các trường hợp viêm phổi có kèm áp xe phổi. Trong các trường hợp này bệnh phẩm tốt nhất là chọc hút phổi qua thành ngực để hút lấy mủ áp xe hay các chất dịch vùng nhu mô phổi bị tổn thương.

**6.2. Có nhiều trường hợp bệnh nhân có dấu hiệu nhiễm trùng huyết rõ ràng nhưng cấy máu vẫn bị âm tính. Có phải như vậy là bệnh nhân có thể bị nhiễm trùng huyết vi khuẩn kỵ khí không?**

- Có nhiều trường hợp như vậy, nhưng không phải tất cả đều là do nhiễm trùng vi khuẩn kỵ khí mà còn có thể là do bệnh nhân bị nhiễm trùng tại chỗ nào đó mà vi khuẩn không vào máu và triệu chứng bệnh lý giống nhiễm trùng huyết là do phản ứng toàn thân của cơ thể đối với tình trạng nhiễm trùng này.
- Để có thể cấy máu kỵ khí, có thể cấy máu trong môi trường đặc biệt, đó là các chai môi trường thioglycolat. Các chai cấy máu này được chế từ môi trường thioglycolat lỏng là môi trường đủ bổ dưỡng và có đủ chất khử để duy trì tình trạng kỵ khí trong môi trường.

**6.3. Tại sao chúng ta không sử dụng phương pháp cấy khóm vi khuẩn này trên ống thạch nghiêng sâu để có thể phân biệt được một khóm vi khuẩn mọc trên mặt thạch phân lập ủ kỵ khí là khóm vi khuẩn kỵ khí hay kỵ khí tuỳ nghi?**

- Ống thạch nghiêng sâu được chế từ môi trường thạch thioglycolat, được làm đặc trong ống sau khi khử trùng để có một phần sâu và một phần nghiêng như ống môi trường KIA hay TSI. Người ta cấy vào ống thạch nghiêng như cấy vào ống thạch KIA hay TSI, tức là sau khi lấy mầm cấy là khóm vi khuẩn lên que hay vòng cấy, đâm sâu vào phần sâu và sau đó cấy zic -zac trên phần mặt nghiêng. Ủ ống môi trường trong điều kiện hiếu khí qua đêm hay 24 giờ. Quan sát vi khuẩn mọc trong ống, nếu chỉ mọc ở phần sâu mà không mọc được trên mặt nghiêng thì đó là vi khuẩn kỵ khí. Nếu vi khuẩn mọc được trên cả mặt nghiêng lẫn dưới phần sâu thì đó là vi khuẩn kỵ khí tùy nghi.

- Tuy nhiên vì đa số *Streptococci* không thể mọc được trên mặt thạch thioglycolat dù chúng có là kỵ khí tuỳ nghi, do vậy thử nghiệm này có thể không phân biệt được *Streptococci* kỵ khí với *Streptococci* kỵ khí tuỳ nghi. Đây chính là một lý do giải thích tại sao có một vài công trình nghiên cứu vi khuẩn kỵ khí lại cho kết quả kháng sinh đồ có tỷ lệ đề kháng quá cao kháng sinh Metronidazol vì có thể trong các công trình này các tác giả đã cho các chủng *Streptococci* kỵ khí tuỳ nghi thành *Streptococci* kỵ khí.

### 6.4. Đối với phòng thí nghiệm không có phương tiện cấy kỵ khí, làm thế nào có thể nhận biết được có tác nhân vi khuẩn kỵ khí trong bệnh phẩm?

- Dù không có phương tiện cấy kỵ khí nhưng phòng thí nghiệm vẫn có thể nhận biết được sự hiện diện của vi khuẩn kỵ khí bằng cách song song với qui trình cấy hiếu khí (cấy không kỵ khí), luôn cấy mẫu vào một ống môi trường thịt bằm (choped meat) hay ống môi trường thioglycolat. Nếu mẫu cấy hiếu khí không có vi khuẩn mọc mà trong các ống môi trường trên lại nhiều vi khuẩn thì rất có khả năng có vi khuẩn kỵ khí, lúc đó chúng ta sẽ tiến hành nhuộm gram để trả lời cho lâm sàng kết quả nhuộm gram và các nhận xét của mình.
- Để đảm bảo các ống thioglycolat và ống thịt băm hoàn toàn khử hết $O_2$ trong phần sâu, trước khi cho bệnh phẩm vào môi trường người ta phải đun sôi các ống môi trường này trong 10 phút để đuổi hết $O_2$ ra khỏi môi trường và sau đó để nguội rồi mới cấy bệnh phẩm vào.

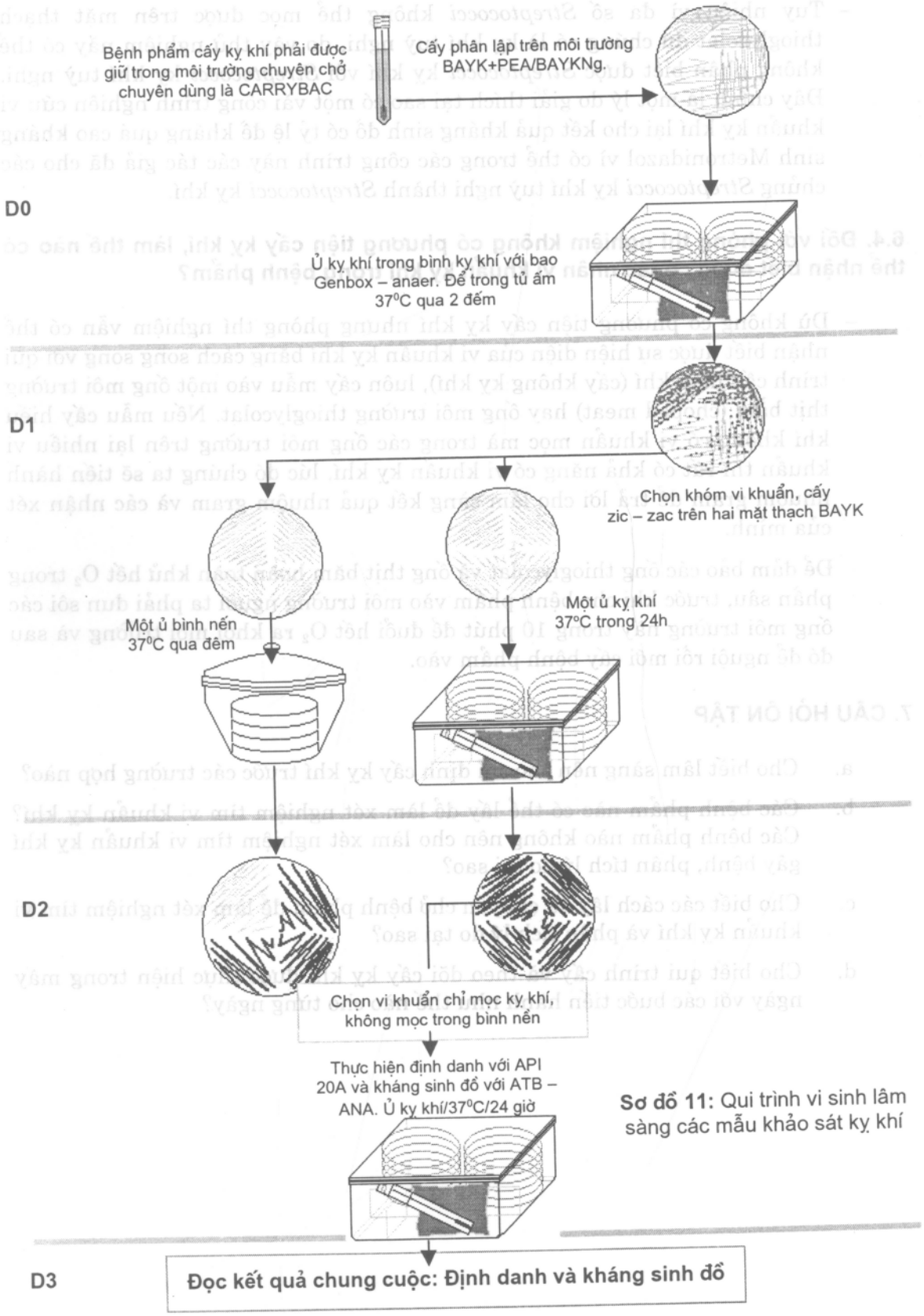
## 7. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết lâm sàng nên cho chỉ định cấy kỵ khí trước các trường hợp nào?

b. Các bệnh phẩm nào có thể lấy để làm xét nghiệm tìm vi khuẩn kỵ khí? Các bệnh phẩm nào không nên cho làm xét nghiệm tìm vi khuẩn kỵ khí gây bệnh, phân tích lý do tại sao?

c. Cho biết các cách lấy và chuyên chở bệnh phẩm để làm xét nghiệm tìm vi khuẩn kỵ khí và phân tích lý do tại sao?

d. Cho biết qui trình cấy và theo dõi cấy kỵ khí được thực hiện trong mấy ngày với các bước tiến hành như thế nào cho từng ngày?




**Sơ đồ 11:** Qui trình vi sinh lâm sàng các mẫu khảo sát kỵ khí

# BÀI 12. KHẢO SÁT TRỰC TIẾP

**MỤC TIÊU**

1. *Sử dụng có hiệu quả phương tiện khảo sát trực tiếp trong xét nghiệm vi sinh lâm sàng các mẫu bệnh phẩm khác nhau nhờ biết được các loại khảo sát trực tiếp có thể thực hiện được tại các phòng thí nghiệm lâm sàng và công dụng của từng loại.*
2. *Phúc trình được các kết quả khảo sát trực tiếp và đồng thời tham vấn được cho lâm sàng các ý nghĩa hữu dụng lâm sàng mà kết quả khảo sát trực tiếp nhờ biết được vai trò và ý nghĩa của khảo sát trực tiếp trong xét nghiệm vi sinh lâm sàng.*
3. *Tránh được các trường hợp phải làm khảo sát trực tiếp một cách vô ích - thậm chí còn cho các thông tin sai lạc đến lâm sàng và không bỏ sót các trường hợp cần thiết phải làm khảo sát trực tiếp vì các ý nghĩa hữu dụng mà kết quả khảo sát trực tiếp mang lại cho lâm sàng và biết được các trường hợp bệnh phẩm nào cần phải làm khảo sát trực tiếp, các trường hợp bệnh phẩm nào không thật sự cần khảo sát trực tiếp.*

## 1.CÁC PHƯƠNG PHÁP KHẢO SÁT TRỰC TIẾP

### 1.1. Soi tươi

- Qua kính hiển vi thường
  - + *Soi tươi không cần nền*, là phương pháp soi tươi qua kính hiển vi đóng bớt tụ quang, với bệnh phẩm được đặt trong một giọt nước muối sinh lý trên một lam kính, treo hay ép dưới một lamel. Phương pháp này dùng để xem sự di động của vi khuẩn.
  - + *Soi tươi cần nền*, là phương pháp soi tươi qua kính hiển vi đóng bớt tụ quang với bệnh phẩm được đặt trong một giọt dung dịch màu làm nền như dung dịch mực tàu; nigrosin; methylen blue, trên một lam kính, ép dưới một lamel. Phương pháp này dùng xem nang vi khuẩn, hay tìm nấm men có trong bệnh phẩm như *Cryptococcus neoformans* trong dịch não tuỷ.
- Qua kính hiển vi nền đen hay đảo pha
  - + *Qua kính hiển vi nền đen*, mục đích thông thường nhất là xem hình dạng và sự di động của vi khuẩn có trong một bệnh phẩm đặt trong một giọt nước muối sinh lý trên một lam kính ép dưới một lamel. Phương pháp này được dùng để tìm xoắn khuẩn giang mai, vi khuẩn *leptospira*, hay khảo sát sự di động vi khuẩn.

+ *Qua kính hiển vi đảo phase*, mục đích thông thường nhất là xem nang vi khuẩn như là *S. pneumoniae*, hay tìm nấm men có trong bệnh phẩm như *Cryptococcus neoformans* trong dịch não tuỷ.

### 1.2. Nhuộm

- *Nhuộm gram*, là phương pháp nhuộm thông thường nhất trong các phòng thí nghiệm vi sinh. Phương pháp nhuộm gram cho phép xác định được hình dạng, cách sắp xếp và phân biệt vi khuẩn là thuộc loại gram [+] hay gram [-].
- *Nhuộm đơn* Methylen blue kiềm, là phương pháp hay được dùng để nhuộm khảo sát có sự hiện diện của vi khuẩn *Corynebacteria* hay không vì phương pháp này cho phép nhuộm vi khuẩn và các hạt biến sắc có trong vi khuẩn.
- *Nhuộm kháng acid*, là phương pháp hay được dùng để nhuộm và phát hiện các vi khuẩn kháng acid như các *Mycobacteria*.
- *Phương pháp nhuộm huỳnh quang*, là phương pháp nhuộm vi khuẩn bằng phẩm màu huỳnh quang và chỉ áp dụng cho một số trường hợp như nhuộm huỳnh quang rhodamin phết đờm tìm vi khuẩn lao.
- *Phương pháp nhuộm kháng thể đặc hiệu đánh dấu men hay đánh dấu huỳnh quang*, là các phương pháp phát hiện trực tiếp vi sinh vật muốn tìm có trong bệnh phẩm nhờ kháng thể đặc hiệu kháng nguyên vi sinh vật được đánh dấu bằng men (phát hiện qua quan sát bằng kính hiển vi thường) hay bằng huỳnh quang (phát hiện qua quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang)
- *Các phương pháp nhuộm khác*, như nhuộm nang, flagella, spore... chỉ được dùng trong các trường hợp đặc biệt.

## 2. VAI TRÒ VÀ Ý NGHĨA CỦA KHẢO SÁT TRỰC TIẾP

### 2.1. Cho kết quả rất sớm, gần như chung cuộc

Có những kết quả khảo sát trực tiếp giúp bác sĩ lâm sàng và phòng thí nghiệm nghĩ ngay đến tác nhân gây bệnh với sự chính xác gần như 99%, ví dụ:

- Kết quả khảo sát trực tiếp dịch não tuỷ thấy có song cầu gram [-]; nghĩ ngay đến tác nhân. *meningitidis*, thấy song cầu gram [+] hình mũi giáo; nghĩ ngay đến *S. pneumoniae*, hay thấy trực khuẩn gram [-] nhỏ; nghĩ ngay đến *H. influenzae*...
- Kết quả soi tươi mủ niệu đạo từ đàn ông thấy có song cầu gram [-]; nghĩ ngay đến tác nhân *N. gonorrhoeae*...
- Kết quả soi tươi dịch não tuỷ thấy có nấm men có nang; nghĩ ngay đến tác nhân nấm men *C. neoformans*...

- Kết quả khảo sát trực tiếp phết quệt cổ tử cung phát hiện *C. trachomatis* bằng phương pháp nhuộm kháng thể huỳnh quang đặc hiệu *C. trachomatis* dương tính là đủ để kết luận bệnh nhân bị nhiễm vi khuẩn này.

Các kết quả như trên rất có giá trị giúp cho bác sĩ điều trị chọn được kháng sinh điều trị ban đầu và giúp phòng thí nghiệm biết được hướng phân lập; định danh; kháng sinh đồ trong xét nghiệm cấy và phân lập tiếp theo.

### 2.2. Cho kết quả sớm và gợi ý

Rất nhiều kết quả khảo sát trực tiếp, nếu biết tận dụng, bác sĩ lâm sàng sẽ có hướng điều trị ban đầu cũng như phòng thí nghiệm có hướng phân lập và định danh, ví dụ:

- Khảo sát trực tiếp nước tiểu, thấy có 1 vi khuẩn/quang trường x100, có thể nghĩ ngay là bệnh nhân bị nhiễm trùng tiểu và có thể chọn lựa kháng sinh điều trị bước đầu tùy theo hình ảnh gram của vi khuẩn hiện diện trong mẫu.
- Khảo sát phết nhuộm gram mẫu mủ, hay abcess, hình ảnh vi khuẩn thấy trong bệnh phẩm qua phết nhuộm gram gợi ý được tác nhân vi khuẩn gây bệnh, nhờ đó bác sĩ lâm sàng sẽ có hướng điều trị ban đầu cũng như phòng thí nghiệm có hướng phân lập và định danh....

### 2.3. Cho kết quả đánh giá mẫu có tin cậy để nuôi cấy, phân lập hay không và cho kết quả gợi ý

- Làm một phết gram mẫu đờm, quan sát ở quang trường x100, có thể đánh giá mẫu tin cậy hay không để có thể tiếp tục thực hiện quá trình nuôi cấy phân lập
- Cũng qua phết nhuộm gram mẫu đờm, nếu mẫu tin cậy, có thể tiếp tục qua quang trường x1000 để quan sát hình ảnh gram các vi khuẩn hiện diện và kết quả này sẽ rất có giá trị gợi ý cho phòng thí nghiệm hướng phân lập vi khuẩn gây bệnh và bác sĩ sẽ có thể có hướng dùng kháng sinh nào trong điều trị ban đầu.

### 2.4. Có những trường hợp mẫu không cần phải làm khảo sát trực tiếp

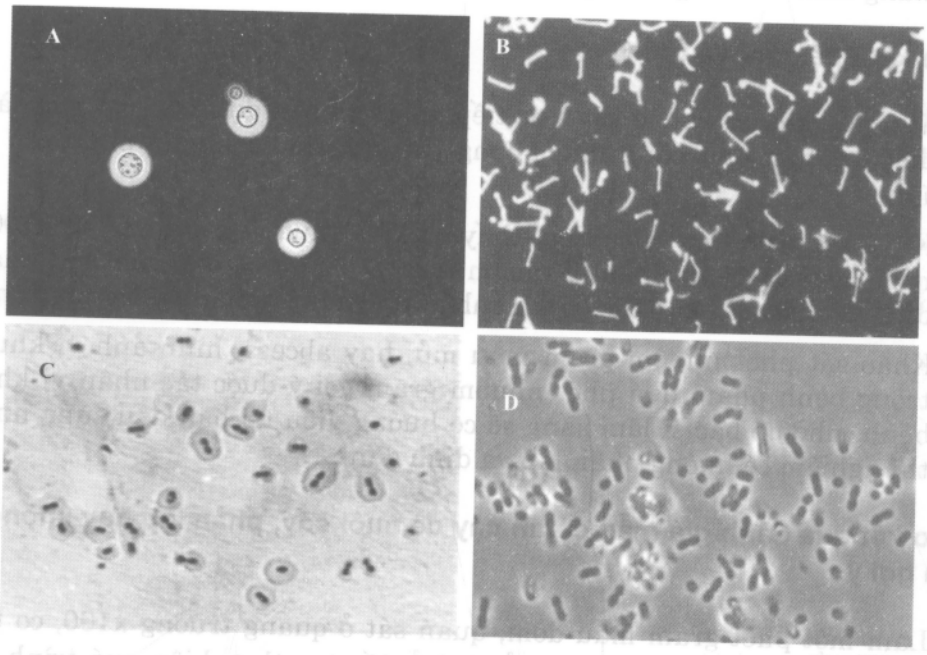
- Mẫu quyệt họng, nếu không có yêu cầu tìm vi khuẩn bạch hầu thì không cần thiết phải làm khảo sát trực tiếp vì không có sự khác biệt giữa mẫu không bệnh với mẫu bệnh.
- Mẫu phân, nếu không có yêu cầu tìm *Campylobacter*, *V. cholerae* thì không cần thiết phải làm khảo sát trực tiếp.

## 3. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết các phương pháp khảo sát trực tiếp và công dụng của từng phương pháp này?

b. Cho biết vai trò và ý nghĩa của các kết quả khảo sát trực tiếp đối với lâm sàng? Nêu các ví dụ cụ thể.

c. Cho biết các trường hợp nào không nhất thiết phải làm khảo sát trực tiếp và các trường hợp nào bắt buộc phải làm khảo sát trực tiếp trước khi tiến hành nuôi cấy phân lập? Tại sao?




**Hình 12.1:** Soi tươi nhiều khi rất có giá trị trong xét nghiệm vi sinh lâm sàng: (A) Một phết soi tươi dịch não tuỷ trong giọt mực tàu cho hình ảnh như vậy rất có giá trị để chẩn đoán viêm màng não do *Cryptococcus neoformans*. (B) Phết soi tươi qua kính hiển vi nền đen giọt môi trường EMJH cấy máu bệnh nhân cho kết như trên giúp kết luận mẫu cấy có vi khuẩn Leptospira. (C) Phản ứng phồng nang (quellung reaction) dùng định type *S.pneumoniae* có thể đọc kết quả qua phết soi tươi trong giọt nigrosin như trên. (D) Soi tươi một giọt môi trường của chai cấy máu qua kính hiển vi đảo pha với hình ảnh như trên giúp sớm nhận biết chai cấy máu [+] trực khuẩn

# BÀI 13. NHUỘM GRAM

**MỤC TIÊU**

1. *Nhận định được một kết quả nhuộm gram tốt hay có vấn đề về mặt kỹ thuật nhờ biết rõ nguyên tắc của phương pháp nhuộm gram.*
2. *Thực hiện được tốt kỹ thuật nhuộm gram các mẫu bệnh phẩm khác nhau nhờ nắm vững được các bước thực hành trong kỹ thuật nhuộm gram.*
3. *Tránh được các yếu tố kỹ thuật làm sai lệch kết quả nhuộm gram và có thể biện luận được một kết quả nhuộm gram có vấn đề về mặt kỹ thuật nhờ biết được các yếu tố kỹ thuật ảnh hưởng lên kết quả nhuộm gram.*

## 1. NGUYÊN TẮC

Do sự khác biệt về cấu trúc vách tế bào nên trong quá trình nhuộm gram, vi khuẩn gram [+] sẽ giữ được phức hợp tím Gentians -iod không bị tẩy màu bởi alcohol, trong khi vi khuẩn gram [-] không giữ được phức hợp màu này, do vậy kết quả sau khi nhuộm là vi khuẩn gram [+] vẫn giữ được màu tím của gentian, còn vi khuẩn gram [-] ăn màu hồng của phẩm màu safranin hay fuchsin.

## 2. BỘ THUỐC NHUỘM GRAM

Để nhuộm gram, cần phải có bộ thuốc nhuộm gram gồm các lọ thuốc thử sau:

- Lọ thuốc nhuộm gram là dung dịch tím gentian
- Lọ lugol là dung dịch iod
- Lọ alcohol 95%
- Lọ safranin chứa dung dịch safranin

Bộ thuốc nhuộm gram được chứa trong các chai sẫm màu, nắp vặn chặt, giữ trong tối ở nhiệt độ phòng.

## 3. PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN

- Trước hết làm một phết rất mỏng bệnh phẩm hay vi khuẩn trên lam kính, để khô tự nhiên, rồi sau đó gắn trên lam bằng cách hơ nhanh qua ngọn lửa đèn cồn hay đèn bunsen 3 lần. Lưu ý là chỉ hơ nhẹ trên ngọn lửa để lam chỉ ấm lên vừa phải chứ không làm lam bị quá nóng vì như vậy sẽ làm biến thể hình dạng vi khuẩn.
- Đặt lam trên giá nhuộm, cho vài giọt thuốc nhuộm gram (crystal violet = tím gentian) phủ trùm lên phết vi khuẩn, để yên trong 1 phút. Sau đó cầm lam lên và rửa sạch màu thừa dính trên lam dưới một vòi nước máy chảy rất nhẹ.

- Đặt lam trở lại trên giá nhuộm, cho tiếp vài giọt lugol (iod) phủ trùm tiếp lên phết vi khuẩn, để yên trong 1 phút. Sau đó cầm lam lên và rửa sạch lugol thừa dính trên lam dưới một vòi nước máy chảy rất nhẹ.
- Tẩy màu bằng cách nhỏ lên góc trên của lam nhuộm dung dịch alcohol 95% cho đến khi giọt alcohol rời khỏi lam sạch màu. Sau đó cầm lam lên và rửa sạch alcohol khỏi lam dưới một vòi nước máy chảy rất nhẹ.
- Để lại lam trên giá nhuộm rồi phủ vài giọt safranin lên phết nhuộm, để yên 1 phút. Sau đó cầm lam lên và rửa sạch safranin thừa dính trên lam dưới một vòi nước máy chảy rất nhẹ.
- Thấm khô lam bằng cách ép lam giữa 2 tờ giấy thấm. Để khô lame hoàn toàn trong không khí. Sau đó nhỏ một giọt dầu soi kính lên phết nhuộm và quan sát qua kính hiển vi, trước hết ở vật kính x 10 để tìm vùng phết bệnh phẩm, sau đó xoay sang vật kính ×100 (vật kính dầu) để quan sát hình thái và cách ăn màu của vi khuẩn.

## 4. ĐỌC KẾT QUẢ

Quan sát phết nhuộm gram qua kính hiển vi, dưới vật kính dầu, chúng ta sẽ thấy vi khuẩn gram [+] ăn màu tím, còn vi khuẩn gram [-] ăn màu hồng.

Khi trả lời một kết quả nhuộm gram, phải trả lời các chi tiết sau:

- Hình dáng vi khuẩn.
- Cách sắp xếp các vi khuẩn.
- Cách ăn màu của vi khuẩn, tức là vi khuẩn gram [+] hay gram [-].

## 5. CÁC SAI LẦM CÓ THỂ GẶP TRONG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GRAM

- Có những sai lầm trong phương pháp nhuộm gram làm cho vi khuẩn gram [+] nhuộm thành màu hồng của vi khuẩn gram n [-], đó là ủ:
  + Phết vi khuẩn ở lứa cấy quá già trên 24 giờ, lúc đó cấu trúc vách vi khuẩn không còn bền chặt như cấu trúc vách vi khuẩn gram [+] lứa cấy trẻ, do vậy mất khả năng ngăn cản sự tẩy màu của alcohol.
  + Dung dịch lugol không còn tốt nữa do đã pha quá lâu và đã mất đi iod, có thể nhận biết trường hợp này khi dung dịch lugol không còn sậm màu nữa.
  + Tẩy màu bằng alcohol quá lâu đã làm cho vi khuẩn gram [+] cuối cùng cũng bị tẩy màu, hay dùng lộn chai tẩy màu alcohol acid của phương pháp nhuộm kháng acid.
- Có những sai lầm trong phương pháp nhuộm gram làm cho vi khuẩn gram [-] nhuộm thành màu tím của vi khuẩn gram n [+], đó là:
  + Phết vi khuẩn quá dày làm cho alcohol không thể tẩy màu toàn bộ vi khuẩn trong phết nhuộm.
  + Tẩy alcohol trong thời gian quá ngắn hay dung dịch alcohol bị pha quá loãng làm cho màu gram không được tẩy khỏi tế bào vi khuẩn.

- Ngoài ra còn có một sai lầm kỹ thuật nữa mà chúng ta thường gặp, đó là sau khi phủ gram, chúng ta không rửa sạch màu thừa trên lam do vậy khi chúng ta phủ lugol trên phết nhuộn thì màu gram thừa sẽ bị tủa lại bám trên bề mặt phết nhuộm. Kết quả khi nhìn qua kính hiển vi chúng ta sẽ thấy rất nhiều tinh thể màu gram bám trên phết nhuộm làm lầm tưởng hình ảnh vi nấm.

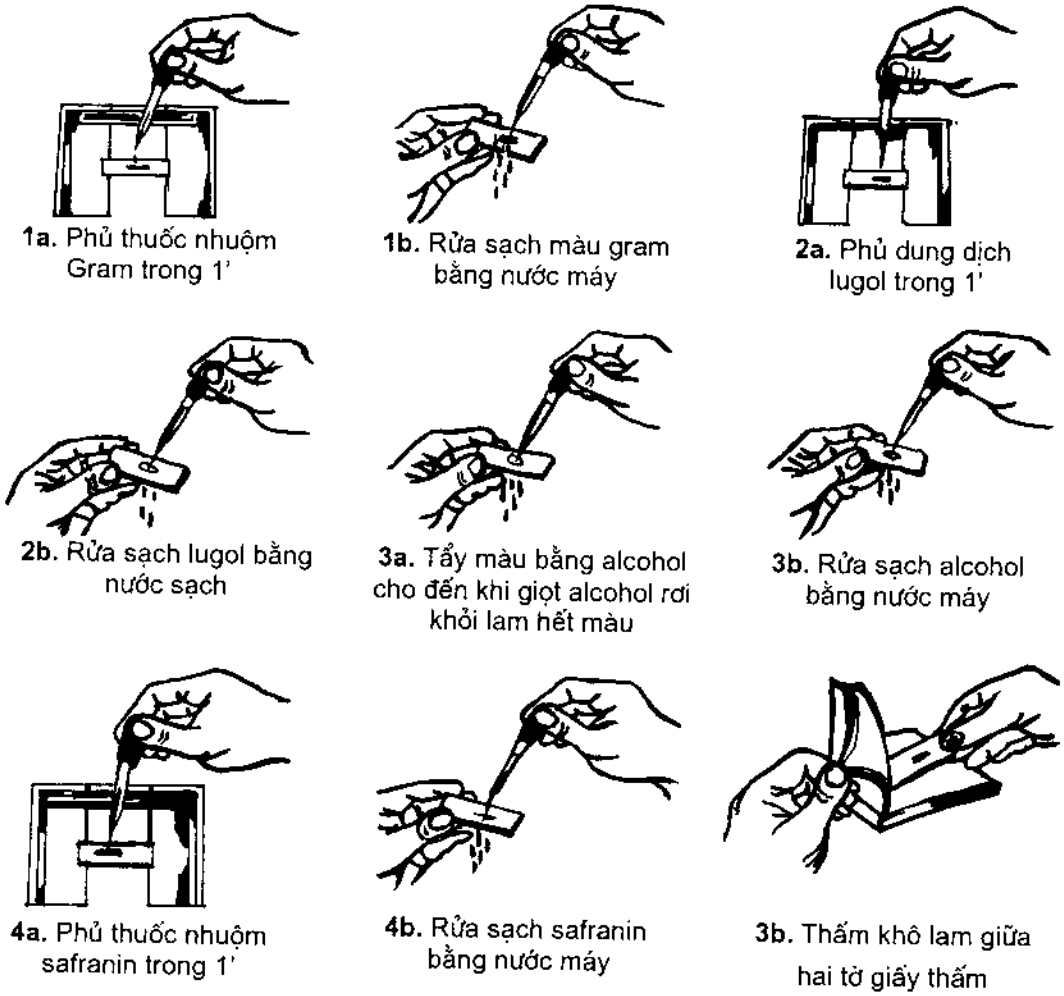
## 6. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết nguyên tắc của phương pháp nhuộm gram.

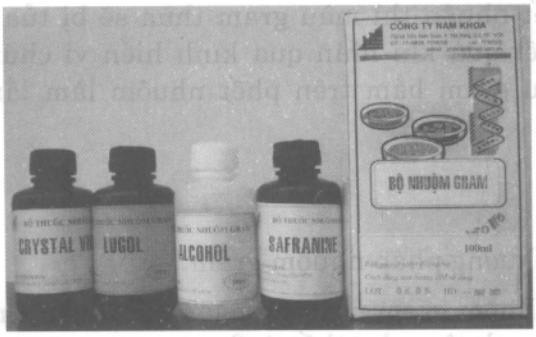
b. Phương pháp tiến hành nhuộm gram như thế nào? Kết quả ăn màu của vi khuẩn sau mỗi giai đoạn nhuộm như thế nào?

c. Cho biết cách trả lời kết quả của một phết nhuộm gram vi khuẩn.

d. Cho biết các sai lầm thường gặp trong phương pháp nhuộm Gram và hậu quả của các sai lầm này.




**Hình 13.1**: Hình vẽ mô tả các giai đoạn tiến hành của phương pháp nhuộm gram




**Hình 13.2:** Một bộ thuốc nhuộm gram đầy đủ



**Hình 13.3:** Kết quả nhuộm gram là gram [+] ăn màu tím, gram [-] ăn màu hồng

# BÀI 14. NHUỘM METHYLEN BLUE KIỀM

**MỤC TIÊU**

1. *Sử dụng hiệu quả phương pháp nhuộm nhuộm methylen blue kiềm, đặc biệt trong phát hiện vi khuẩn Corynebacterium diphthriae trong các mẫu quệt hầu họng nhờ biết được nguyên tắc và mục đích của phương pháp nhuộm này.*
2. *Thực hiện được tốt kỹ thuật nhuộm đơn này nhờ nắm vững được các bước thực hành trong kỹ thuật nhuộm methylen blue kiềm.*

## 1. NGUYÊN TẮC

Methylene blue khi được làm kiềm hoá thì sẽ nhuộm được các hạt biến sắc của các trực khuẩn *Corynebacteria*, đặc biệt là trực khuẩn bạch hầu. Do vậy nhuộm methylene blue kiềm ngoài mục đích dùng để nhuộm đơn, nhuộm nền sau khi nhuộm kháng acid, còn có mục đích chính là nhuộm các phết bệnh phẩm quệt hầu họng để phát hiện *Corynebacterium diphtheriae*.

## 2. BỘ THUỐC NHUỘM METHYLEN BLUE KIỀM

Để nhuộm methylen blue kiềm, cần có chai thuốc nhuộm methylen blue kiềm chứa trong chai sẫm màu, nắp vặn chặt, giữ trong tối ở nhiệt độ phòng.

## 3. PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN

- Trước hết làm một phết mỏng bệnh phẩm hay vi khuẩn trên lam kính, để khô tự nhiên, rồi sau đó gắn trên lam bằng cách hơ nhanh qua ngọn lửa đèn cồn hay đèn bunsen 3 lần. Lưu ý là chỉ hơ nhẹ trên ngọn lửa để lam chỉ ấm lên vừa phải chứ không làm lam bị quá nóng vì như vậy sẽ làm biến thể hình dạng vi khuẩn.
- Đặt lam trên giá nhuộm, cho vài giọt thuốc nhuộm methylene blue kiềm phủ trùm lên phết vi khuẩn, để yên trong 1 phút. Sau đó cầm lam lên và rửa sạch màu thừa dính trên lam dưới một vòi nước máy chảy rất nhẹ.
- Thấm khô lam bằng cách ép lam giữa 2 tờ giấy thấm. Để khô lam hoàn toàn trong không khí. Sau đó nhỏ một giọt dầu soi kính lên phết nhuộm và quan sát qua kính hiển vi, trước hết ở vật kính x10 để tìm vùng phết bệnh phẩm, sau đó xoay sang vật kính ×100 (vật kính dầu) để quan sát hình thái và cách ăn màu của vi khuẩn.

## 4. ĐỌC KẾT QUẢ

Tế bào vi khuẩn bắt màu xanh biển nhạt, các hạt biến sắc bắt màu tím đen (xem hình 21A).




**Hình 14:** Một chai nhựa sẫm màu chứa bên trong thuốc nhuộm alkalin methylen blue

# BÀI 15. NHUỘM KHÁNG ACID

**MỤC TIÊU**

1. *Tránh các sai sót kỹ thuật nếu có trong khi thực hành nhuộm kháng acid nhờ biết được các nguyên tắc của phương pháp nhuộm kháng acid, biết được trong phương pháp nhuộm kháng acid, khâu nào là quyết định được tính chính xác của kết quả.*
2. *Thực hiện được tốt kỹ thuật nhuộm kháng acid này nhờ nắm vững được các bước thực hành trong kỹ thuật nhuộm này.*
3. *Biện luận được kết quả phương pháp nhuộm kháng acid đặc biệt khi phết nhuộm có sơ sót xảy ra nhờ biết được các sơ sót kỹ thuật có thể xảy ra trong khi thực hành phương pháp nhuộm kháng acid.*

## 1. NGUYÊN TẮC

Do tế bào vi khuẩn kháng acid có lớp vỏ sáp bao bọc nên khi đã nhuộm được phức hợp màu carbolfuchsin, phức hợp này sẽ không bị tẩy màu bởi dung dịch tẩy màu mạnh (acid, alcohol acid). Tuy nhiên để phức hợp màu này có thể thấm xuyên qua lớp vỏ sáp của vi khuẩn, có hai cách: (1) Đun nóng phết nhuộm với dung dịch màu carbolfuchin, nhờ đó mà carbolfuchsin thấm qua lớp vỏ sáp của vi khuẩn để nhuộm màu vi khuẩn; đây là phương pháp nhuộm nóng Ziehl Neelsen. (2) Phương pháp thứ hai là phương pháp nhuộm lạnh còn gọi là phương pháp Kinyoun, trong phương pháp này người ta dùng dung dịch carbolfuchsin đậm đặc, nhờ vậy khi phủ dung dịch màu đậm đặc này lên phết nhuộm với thời gian lâu, carbolfuchsin vẫn có thể thấm qua lớp vỏ sáp để nhuộm màu vi khuẩn.

## 2. BỘ THUỐC NHUỘM KHÁNG ACID

Để nhuộm kháng acid, cần phải có bộ thuốc nhuộm kháng acid gồm các lọ thuốc thử sau:

- Lọ thuốc nhuộm carbolfuchsin là dung dịch basic fuchsin với phenol, được pha đậm đặc để vẫn có thể dùng cho phương pháp nhuộm lạnh.
- Lọ alcohol -acid với alcohol 70% và acid chlohydric 3%.
- Lọ methylen blue chứa dung dịch màu methylen blue.

Bộ thuốc nhuộm kháng acid được chứa trong các chai sẫm màu, nắp vặn chặt, giữ trong tối ở nhiệt độ phòng.

## 3. PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN

Phương pháp trình bày sau đây là phương pháp nhuộm lạnh, với các bước như sau:

- Trước hết làm một phết mỏng bệnh phẩm hay vi khuẩn trên lam kính, để khô tự nhiên, rồi sau đó gắn trên lam bằng cách hơ nhanh qua ngọn lửa đèn cồn hay đèn bunsen 3 lần.
- Đặt lam trên giá nhuộm, cho vài giọt thuốc nhuộm carbolfuchsin phủ trùm lên phết vi khuẩn, để yên trong 5 phút. Sau đó cầm lam lên và rửa sạch màu thừa dính trên lam dưới một vòi nước máy chảy rất nhẹ.
- Tẩy màu bằng cách nhỏ trên góc trên của lam nhuộm dung dịch alcohol acid cho đến khi giọt alcohol rời khỏi lam sạch màu. Sau đó rửa sạch alcool acid khỏi lam dưới một vòi nước máy chảy rất nhẹ.
- Để lại lam trên giá nhuộm rồi phủ vài giọt methylen blue lên phết nhuộm, để yên 1 phút. Sau đó cầm lam lên và rửa sạch methylen blue thừa dính trên lam dưới một vòi nước máy chảy rất nhẹ.
- Thấm khô lam bằng cách ép lam giữa 2 tờ giấy thấm. Để khô lam hoàn toàn trong không khí. Sau đó nhỏ một giọt dầu soi kính lên phết nhuộm và quan sát qua kính hiển vi, trước hết ở vật kính x10 để tìm vùng phết bệnh phẩm, sau đó xoay sang vật kính x100 (vật kính dầu) để quan sát tìm trực khuẩn kháng acid.

## 4. ĐỌC KẾT QUẢ

Quan sát phết nhuộm kháng acid qua kính hiển vi, dưới vật kính dầu, trực khuẩn kháng acid ăn màu đỏ cánh sen, còn vi khuẩn thường cũng như các nền khác như tế bào biểu mô hay bạch cầu ăn màu xanh methylen blue.

Khi trả lời một kết quả nhuộm kháng acid, không được kết luận là dương tính *M. tuberculosis* mà chỉ trả lời có hiện diện trực khuẩn kháng acid.

Riêng đối với mẫu đờm, cần quan sát 3 dòng, mỗi dòng quan sát khoảng 100 quang trường (QT) dầu, ghi nhận kết quả theo bảng dưới đây để trả lời trên phiếu trả lời kết quả:

**Bảng 15:** Cách ghi kết quả quan sát phết nhuộm kháng acid một mẫu đờm

| Số trực khuẩn kháng acid/số quang trường | Cách ghi kết quả |
|---|---|
| 1-2/300 QT (3 dòng) | +/- |
| 1-9/100 QT (1 dòng) | 1+, số trung bình /100 QT |
| 1-9/10 QT | 2+, số trung bình /10 QT |
| 1-9/1 QT | 3+, số trung bình /1QT |
| >9/1 QT | 4+, >9/QT |

## 5. CÁC SAI LẦM KỸ THUẬT CÓ THỂ GẶP TRONG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM KHÁNG ACID

Phết nhuộm quá dày sẽ làm alcohol acid không thể tẩy hết màu carbolfuchsin, vì vậy những trực khuẩn không kháng acid vẫn ăn màu đỏ cánh sen. Tuy nhiên có thể phân biệt được đây không phải là vi khuẩn kháng acid khi quan sát màu vùng nhầy hay tế bào biểu mô hay bạch cầu chung quanh vẫn còn màu đỏ chứng tỏ màu không bị tẩy hết. Ngoài ra, trực khuẩn không có hình dạng tiêu biểu của trực khuẩn kháng acid: mập, không mảnh khảnh như trực khuẩn kháng acid thực sự.

Màu carbolfuchsin bị cặn, sẽ đóng lên phết nhuộm làm alcohol acid không thể tẩy hết màu và do vậy vi khuẩn thường vẫn nhuộm màu đỏ cánh sen như trên. Để tránh tình trạng này, phải thường xuyên lọc màu qua giấy lọc mỗi khi kiểm tra nhỏ màu carbolfuchsin lên một lam trống thấy có cặn sau khi đổ bỏ carbolfuchsin khỏi lam.

Thời gian phủ màu carbolfuchin quá ngắn không đủ 5 phút, hay dùng carbolfuchsin pha cho phương pháp nhuộm nóng để nhuộm lạnh, do vậy trực khuẩn kháng acid không bắt được màu carbolfuchsin.

Để tránh các sai lầm trên, nên nhuộm kiểm tra chất lượng trước mỗi lô thuốc nhuộm mới pha và định kỳ mỗi tháng một lần đối với lô thuốc nhuộm đang sử dụng.

## 6. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết nguyên tắc của phương pháp nhuộm kháng acid.

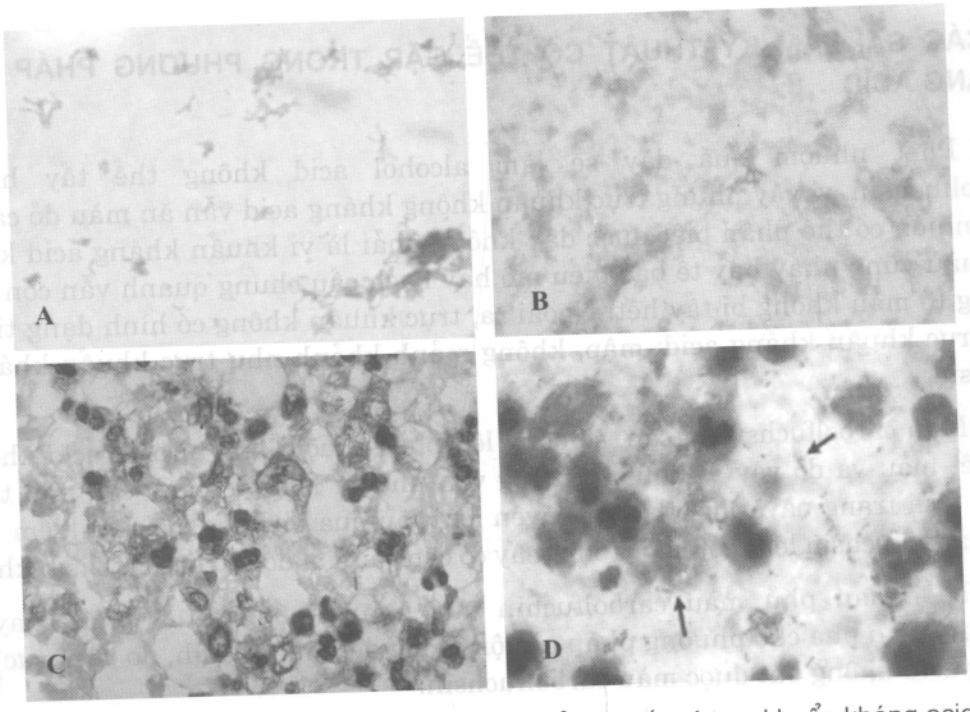
b. Có mấy phương pháp tiến hành nhuộm kháng acid? Phương pháp nhuộm lạnh tiến hành như thế nào? Kết quả ăn màu của vi khuẩn sau mỗi giai đoạn nhuộm?

c. Cho biết cách trả lời kết quả của một phết nhuộm kháng acid một mẫu đờm.

d. Cho biết các sai lầm thường gặp trong phương pháp nhuộm kháng acid và hậu quả của các sai lầm này.




**Hình 15.1:** Một bộ thuốc nhuộm kháng acid hoàn chỉnh bao gồm một chai carbol fuchsin, một chai alcohol acid và một chai methylen blue




**Hình 15.2:** Một số hình ảnh quan sát qua kính hiển vi thấy có trực khuẩn kháng acid. (A) Phết nhuộm kháng acid làm từ khóm vi khuẩn *M.tuberculosis*, (B) Mẫu đờm tập trung và thuần nhất; (C) Mẫu đờm thấy nhiều *M.avium*; (D) Mẫu đờm không tập trung

# PHỤ LỤC

## Sản phẩm liên quan SPUTAPREP Bộ thuốc thử thuần nhất, loại trừ tạp nhiễm và tập trung đờm

### Nguyên tắc hoạt động

Nhờ tác dụng của dung dịch kiềm có chứa N -Acetyl-L-Cystein (NALC) mà các chất nhầy có trong đờm bị làm tan hoàn toàn và đồng thời vi khuẩn tạp nhiễm trong đờm cũng bị pH kiềm ly giải. Sau đó, mẫu đờm đã thuần nhất và loại trừ tạp nhiễm này được trung hoà lại bằng đệm phosphat, và cuối cùng cặn đờm được tập trung bằng ly tâm. Cặn đờm này sẽ tập trung rất nhiều *Mycobacteria* để sẵn sàng cho nuôi cấy, khảo sát trực tiếp, hay làm ly trích ADN cho thử nghiệm PCR.

### Trình bày

SPUTAPREP gồm các thành phần sau:

- N-Acetyl-L-Cystein (NALC) bột nguyên chất chứa trong 5 tube Eppendorf nhỏ, mỗi tube chứa NALC đủ dùng cho xử lý 2 mẫu đờm.
- Dung dịch MUCOPREP có sodium citrat và NaOH, 50ml chứa trong lọ nắp vặn chặt. Lượng dung dịch nầy đủ dùng cho xử lý 10 mẫu đờm.

– Dung dịch đệm phosphat đậm đặc 10 lần, 5ml, chứa trong tube 5ml, nắp vặn chặt.

Bộ thuốc thử SPUTAPREP chưa dùng hay ngay sau khi dùng nên được giữ trong tủ lạnh 4°C cho đến ngày hết hạn ghi trên hộp (2 năm sau ngày sản xuất).

**Qui trình thuần nhất, loại trừ ngoại nhiễm và tập trung mẫu đờm với SPUTAPREP**

– Trước hết, pha loãng đệm phosphat 10X với 45ml nước cất vô trùng để có 50ml đệm phosphat 1X. Giữ đệm phosphat 1X này trong một lọ sạch và trữ trong tủ lạnh 4°C.

– Để xử lý mẫu đờm, đầu tiên chuẩn bị một tube ly tâm 15ml nắp vặn. Cho vào tube 10ml MUCOPREP và toàn bộ bột NALC từ 1 tube Eppendorf. Lắc nhẹ cho tan NALC trong MUCOPREP, chia 5ml dung dịch này vào một tube 15ml khác, như vậy là có 2 tube, mỗi tube có 5ml để xử lý cho hai mẫu đờm. Dung dịch NALC chỉ dùng trong ngày, không lưu lại cho ngày sau.

– Cho tối đa 5ml đờm vào tube 15ml chưa 5ml NALC trên. Lắc đều, hay vortex trong vòng vài phút cho tan hoàn toàn đờm. Sau đó cho thêm 5ml đệm phosphat một lần. Lắc nhẹ để trộn đều.

– Ly tâm với một máy ly tâm bàn tốc độ tối đa (4.000 RPM) trong 15 phút. Đổ bỏ phần nước nổi, chừa khoảng 0,5ml cặn. Cặn được dùng làm phết nhuộm kháng acid, cấy vào môi trường cấy lao (Lownstein Jensen hay Bactec), hay để ly trích ADN cho PCR lao.




**Hình 15.3:** Hai bộ thuốc thử thuần nhất, loại trừ tạp nhiễm và tập trung đờm thường dùng và các thành phần chính bên trong. Bộ SPUTAPREP-LJ dành cho xử lý mẫu đờm cấy trên môi trường Loweinstein Jensen hay làm PCR. Bộ SPUTAPREP – OGW dành cho xử lý mẫu đờm cấy trên môi trường Ogawa

# BÀI 16. THỬ NGHIỆM LAL PHÁT HIỆN ENDOTOXIN (LIMULUS AMEBOCYTES LYSATE)

**MỤC TIÊU**

1. *Hiểu được nguyên tắc của thử nghiệm LAL phát hiện endotoxin và các chỉ định áp dụng để có thể đưa vào thành một phương tiện chẩn đoán vi sinh lâm sàng giúp chẩn đoán phát hiện nhanh nhiễm trùng trong một số trường hợp cần thiết.*
2. *Thực hiện được xét nghiệm LAL với kết quả chính xác không bị âm tính hay dương tính giả nhờ biết được các đòi hỏi đặc biệt về vật liệu khi tiến hành lấy, chứa bệnh phẩm, cũng như khi tiến hành làm xét nghiệm.*
3. *Làm được thử nghiệm LAL định tính và định lượng một cách chính xác, không sơ sót.*

## 1. NGUYÊN TẮC

Endotoxin là lipopolysaccharid có nguồn gốc từ vách tế bào của vi khuẩn gram [-], có một tính chất rất đặc trưng là ly giải tế bào amebocyt tuần hoàn trong máu con sam (horseshoes = *Limulus polyphemus*). Dịch ly giải amebocytes sẽ bị đục đi cũng như bị đông lại thành gel do độ nhớt bị gia tăng và độ đục cũng như độ đông cứng sẽ tùy thuộc vào lượng endotoxin có trong mẫu thử. Cơ chế của hiện tượng này thật ra chưa rõ, có thể giống như hiện tượng đông máu ở người trong đó có hai quá trình xảy ra: (1) Endotoxin với sự hiện diện của ion calci kích hoạt một hệ thống men tiền đông giống trypsin. (2) Hệ thống men bị kích hoạt này sẽ làm biến đổi chất gây đông (coagulogen) bằng một quá trình ly giải protein có giới hạn để sản sinh ra các protein có thể đông đặc được.

Để đọc được kết quả của thử nghiệm LAL, có thể có hai phương pháp:

- Phương pháp phát hiện dung dịch thử nghiệm bị tăng độ nhớt, kết quả là độ đục tăng lên và bị đông đặc lại (đọc bằng mắt thường, hay đọc bằng máy đo độ đục).
- Phương pháp sinh màu dựa trên nguyên tắc protein bị ly giải sẽ làm một protein khác (có mã số S -2423) trong dung dịch sinh màu sinh ra màu, độ đậm nhạt của màu sẽ tùy thuộc vào hàm lượng endotoxin thử nghiệm và chính nhờ vậy có thể định lượng được endotoxin.

## 2. CHỈ ĐỊNH ÁP DỤNG

Thử nghiệm LAL được chỉ định để phát hiện và định lượng endotoxin trong các mẫu dịch truyền hay thuốc tiêm trong sản xuất dược phẩm vì có độ nhạy cao hơn thử nghiệm phát hiện chí nhiệt tố thực hiện trên thỏ.

Thử nghiệm LAL cũng có thể áp dụng tại các phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng để phát hiện một cách gián tiếp nhiễm trùng vi khuẩn gram [-] trong các dịch không tạp nhiễm của cơ thể như: dịch não tuỷ, dịch màng phổi, dịch mật, dịch ổ bụng. Phương pháp có lợi điểm là có kết quả nhanh chỉ vài giờ sau khi gửi mẫu đi làm xét nghiệm. Tuy nhiên phương pháp này không thể thay thế nuôi cấy vì không cho biết vi khuẩn gây nhiễm trùng là vi khuẩn gì và không thể cho biết được kết quả kháng sinh đồ.

Để có thể có kết quả không bị dương tính giả vì mẫu bị tạp nhiễm endotoxin trong lấy và chứa mẫu, các vật liệu dùng để lấy và chứa mẫu phải thật sự tinh sạch và không có endotoxin. Tốt nhất là dùng các vật liệu bằng nhựa polystyren vô trùng bằng gamma để chứa mẫu (lọ vô trùng nắp đỏ của công ty Nam Khoa) và lấy mẫu bằng ống chích thuỷ tinh vô trùng (đã xử lý như hướng dẫn ở mục tiếp theo). Để kết quả không bị âm tính giả thì các vật liệu để lấy và chứa mẫu cũng không có đặc tính hấp phụ endotoxin, nghĩa là chúng ta phải tránh dùng các vật liệu bằng nhựa polypropylen (nhựa PP).

## 3. CHUẨN BỊ VẬT LIỆU

### 3.1. Vật liệu thủy tinh

Tốt nhất là nên dùng các vật liệu thủy tinh mới. Với các vật liệu thủy tinh mới, cần bọc giấy nhôm rồi hấp khử trùng 121°C trong 1 giờ, sau đó sấy khô 175°C trong 3 giờ.

Với các vật liệu thủy tinh đã dùng rồi, cần phải ngâm trong dung dịch 1% tẩy kiềm, ví dụ dung dịch 1% E-TOXA-CLEAN® của Sigma (Catalog No. 210-3), thời gian ngâm tốt nhất là qua đêm. Khi ngâm có thể dùng chổi để chà sạch. Sau khi ngâm rửa 8-10 lần dưới vòi nước nóng đang chảy, sau đó rửa 5 lần dưới vòi nước cất hay nước khử ion. Cuối cùng tráng lại một lần với nước đã khử endotoxin. Sấy khô dụng cụ trong tủ sấy, sau đó bọc giấy nhôm rồi khử trùng giống như trên.

### 3.2. Vật liệu nhựa

Chỉ dùng các vật liệu nhựa vô trùng, không nhiễm endotoxin để pha các thuốc thử. Chỉ dùng một lần, không dùng lại. Ở đây chúng tôi khuyên dùng các pipet Pasteur nhựa vô trùng, các đầu type nhựa vô trùng dùng trong các phòng thí nghiệm thao tác vô trùng. Riêng vật liệu dùng pha gam chuẩn endotoxin hay pha bệnh phẩm thì cần phải bằng polystyren chứ không thể bằng polypropylen vì polypropylen hấp phụ được endotoxin. Ở đây chúng tôi khuyên dùng các pipet vô trùng có chia độ, bằng polystyren, vô trùng (loại đóng gói riêng lẽ, dùng một lần).

## 4. TIẾN HÀNH THỬ NGHIỆM

Ở đây trình bày phương pháp thử nghiệm dùng thuốc thử E -toxat của Sigma. Phương pháp này có thể dùng với số lượng mẫu nhỏ.

### 4.1. Pha gam endotoxin chuẩn

Dùng micropipet với tip vô trùng và không nhiễm endotoxin hút một thể tích nước cất không nhiễm endotoxin (Sigma, catalog No 210-7) cho vào chai chứa endotoxin đông khô (Sigma, catalog No 210-SE) để đạt nồng độ endotoxin 4000 EU/ml (n.độ gốc). Vortex để trộn đều trong vòng ít nhất 2 phút. Sau đó vortex thêm 3 lần trong vòng 30 phút (mỗi lần 30 giây, nghỉ 10 phút). Sau khi đã pha, dung dịch endotoxin chuẩn này được giữ trong tủ lạnh, bền hơn 2 tuần nếu không bị tạp nhiễm. Tránh giữ trong tủ đông. Mỗi lần dùng thì phải vortex trộn đều như trên.

Pha gam endotoxin chuẩn trong tube polystyren vô trùng, không nhiễm endotoxin và có nắp đậy. Nếu không có tube polystyren thì phải dùng các tube thủy tinh đã khử trùng và khử endotoxin. Pha như trình bày trong bảng 16.1.

Cứ mỗi độ pha loãng, cần phải vortex khoảng 30-60 giây trước khi pha một độ pha loãng kế. Bất cứ một độ pha loãng nào nếu để lâu quá 30 phút thì phải vortex trở lại như trên trước khi dùng. Endotoxin với nồng độ từ 400 EU/ml trở lên thì có thể bền đến hơn 1 tuần nếu giữ trong tủ lạnh (không giữ đông đá).

**Bảng 16.1:** Cách pha dung dịch endotoxin chuẩn

| Ống số | Thể tích dung dịch endotoxin được lấy | Nước không endotoxin | Nồng độ endotoxin |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,2 ml n.độ gốc | 1,8 ml | 400 EU |
| 2 | 0,2 ml từ ống 1 | 1,8 ml | 40 EU |
| 2 | 0,2 ml từ ống 2 | 1,8 ml | 4 EU |
| 2 | 0,3 ml từ ống 3 | 2,1 ml | 0,5 EU |
| 2 | 1 ml từ ống 4 | 1 ml | 0,25 EU |
| 2 | 1 ml từ ống 5 | 1 ml | 0,125 EU |
| 2 | 1 ml từ ống 6 | 1 ml | 0,06 EU |
| 2 | 1 ml từ ống 7 | 1 ml | 0,03 EU |
| 3 | 1 ml từ ống 8 | 1 ml | 0,015 EU |

### 4.2.Tiến hành thử nghiệm

Trước hết mỗi mẫu thử nghiệm phải được chỉnh pH đạt từ 6-8 (thích hợp nhất là 6,8 đến 7.,). Chỉnh pH với dung dịch HCl 0,1M không lẫn endotoxin và dùng giấy thử pH chứ không dùng pH kế.

Vỗ nhẹ chai chứa E -TOXATE (Sigma, catalog No 210-20) xuống mặt bàn để E -TOXATE không dính trên nắp cao su. Dùng micropipet với tip vô trùng và không nhiễm endotoxin hút 2 ml nước cất không nhiễm endotoxin cho vào chai. Không được lắc mạnh, chỉ lăn tròn chai để hòa tan. Ngay sau khi hòa tan, cho lọ vào trong đá bào. Phân phối vào các tube thủy tinh vô trùng đã khử endotoxin và có đậy miệng tube bằng giấy nhôm, mỗi tube 0,1 ml. Các tube E -TOXATE này phải luôn giữ trong đá bào. Dung dịch E -TOXATE đã pha xong nên được dùng ngay trong ngày. Các tube dung dịch E -TOXATE chưa dùng thì phải giữ trong tủ đông và khi

đó độ nhạy sẽ giảm đi rất ít. Tránh rã đông nhiều lần vì như vậy thì độ nhạy sẽ giảm đi rất nhanh.

*Phương pháp định lượng:* đó là trường hợp kiểm tra chất lượng phát hiện endotoxin trong thuốc tiêm, dịch truyền; mỗi mẫu thử nghiệm riêng lẽ phải dùng 6 tube E -TOXATE đánh số từ 1 đến 6 và cho vào tube mẫu thử, chứng [-], chứng ức chế (ƯC), cũng như các nồng độ endotoxin chuẩn theo hướng dẫn trình bày trong bảng 7.

*Phương pháp định tính:* đó là trường hợp phát hiện endotoxin trong các bệnh phẩm như máu, huyết thanh, dịch não tuỷ, dịch mật... để tìm bằng chứng sớm phát nhiện có vi khuẩn gram [-] trong mẫu. Trong mục đích này, các mẫu thử phải lấy vô trùng bằng các dụng cụ không chứa endotoxin và không có tính chất hấp phụ endotoxin. Mỗi mẫu thử nghiệm riêng lẽ phải dùng 4 tube E -TOXATE đánh số từ 1 đến 4 và cho vào tube mẫu thử, chứng [-], chứng [+], chứng ức chế (ƯC) theo hướng dẫn trình bày bảng 16.2.

Sau đó, đậy miệng tube lại bằng giấy nhôm. Ủ ngay các tube trong máy cách thủy 37°C, không được dao động ống nghiệm trong suốt quá trình ủ vì như vậy dù thử nghiệm [+] thì dung dịch trong tube cũng không thể đông lại được mà chỉ tăng độ nhớt mà thôi.

**Bảng 16.2:** Cách chuẩn bị các tube thử nghiệm trong phương pháp định lượng

| Tube | Để phát hiện | Mẫu thử | Nước không endotoxin | Endotoxin chuẩn |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Endotoxin 0,03 EU/ml | 0 ml | | 0,1 ml dung dịch 0,03 EU /ml |
| 2 | Endotoxin 0,06 EU/ml | 0 ml | | 0,1 ml dung dịch 0,06 EU /ml |
| 3 | Endotoxin 0,125 EU/ml | 0 ml | | 0,1 ml dung dịch 0,125 EU /ml |
| 4 | Chứng [-] | 0 ml | 0,1 ml | 0,0 ml |
| 5 | Chứng ƯC | 0,1 ml | 0,0 ml | 0,01ml dung dịch 4EU/ml |
| 6 | Endotoxin mẫu thử | 0,1 ml | 0,0 ml | 0,0 ml |

**Bảng 16.3**: Cách chuẩn bị các tube thử nghiệm trong phương pháp định tính

| Tube | Để phát hiện | Mẫu thử | Nước không endotoxin | Endotoxin chuẩn |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Chứng [+] | 0 ml | | 0,1 ml dung dịch 4 EU /ml |
| 2 | Chứng [-] | 0 ml | 0,1 ml | 0,0 ml |
| 3 | Chứng ƯC | 0,1 ml | 0,0 ml | 0,01ml dung dịch 4 EU /ml |
| 4 | Endotoxin mẫu thử | 0,1 ml | 0,0 ml | 0,0 ml |

## 5. ĐỌC KẾT QUẢ

Sau khi ủ 37°C trong một giờ, cẩn thận lấy từng tube ra khỏi máy cách thủy, nghiêng nhẹ từ từ đến một góc 180°, vừa nghiêng vừa quan sát gel nếu đã hình

thành trong ống nghiệm. Kết quả được đọc là [+] khi dung dịch trong ống hoàn toàn thành gel cứng cho phép nghiêng hoàn toàn ống nghiệm mà gel không vỡ ra. Nếu không có gel cứng thì kết quả phải đọc là k [-]. Lưu ý là động tác nghiêng ống thử nghiệm để đọc kết quả chỉ làm một lần vì nếu làm lại thì gel sẽ bị vỡ ngay.

*Đối với phương pháp định lượng,* kết quả định lượng biện luận như ví dụ trình bày trong bảng 16.4.

*Đối với phương pháp định tính,* kết quả mẫu thử có endotoxin khi chứng [+] cho kết quả [+], chứng [-] cho kết quả [-], không có ức chế (kết quả chứng ức chế [+]) và mẫu thử cho kết quả [+]. Mẫu thử không có endotoxin khi chứng [+] cho kết quả [+], chứng [-] cho kết quả [-], không có ức chế (chứng ức chế [+]) và mẫu thử cho kết quả [-]. Kết quả không đọc được khi có ức chế (tức là kết quả chứng ức chế là [-]). Mẫu có kết quả [+] là mẫu có nhiễm vi khuẩn gram [-] vì endotoxin là thành phần lipopolysaccharid của vách vi khuẩn gram [-].

**Bảng 16.4:** Cách biện luận kết quả trong phương pháp định lượng

| Tube | Kết quả |
|---|---|
| 1 | [-] |
| 2 | [+] |
| 3 | [+] |
| 4 | [-] |
| 5 | [+] |
| 6 | [+] |

Mẫu có chứa endotoxin ≥ 0,06 IU/ml

| Tube | Kết quả |
|---|---|
| 1 | [-] |
| 2 | [+] |
| 3 | [+] |
| 4 | [-] |
| 5 | [-] |
| 6 | [-] |

Mẫu có chứa chất ức chế thử nghiệm

## 6. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết nguyên tắc của thử nghiệm LAL.

b. Cho biết các áp dụng của thử nghiệm LAL, đặc biệt là trong xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

c. Để có thể có kết quả chính xác, hãy cho biết các vật liệu dùng để lấy và chứa bệnh phẩm phải đáp ứng được các điều kiện gì? Và muốn đáp ứng các điều kiện này thì phải dùng các vật liệu gì?

d. Các vật liệu nhựa và thuỷ tinh dùng trong thí nghiệm LAL phải đáp ứng được các điều kiện gì? Và muốn đáp ứng các điều kiện này thì phải dùng các vật liệu gì?

e. Hãy trình bày cách làm một thí nghiệm LAL và cách đọc – phân tích kết quả.

# BÀI 17. KIỂM TRA VI SINH KHÔNG KHÍ

**MỤC TIÊU**

1. *Đưa được việc kiểm tra vi sinh không khí vào thành một trong các qui trình giám sát nhiễm trùng tại bệnh viện vì biết rõ mục đích và chỉ định của việc kiểm tra không khí.*
2. *Lựa chọn được phương pháp kiểm tra vi sinh không khí nào tại bệnh viện của mình cho phù hợp với điều kiện tài chính cũng như phương tiện tại phòng thí nghiệm nhờ biết được nhiều phương pháp kiểm tra vi sinh không khí khác nhau.*
3. *Áp dụng được phương pháp lắng bụi của Koch dùng trong kiểm tra vi sinh không khí tại bệnh viện của mình vì đây là phương pháp phù hợp nhất hiện nay.*
4. *Dựa trên kết quả kiểm tra vi sinh không khí, đánh giá chất lượng không khí phòng mổ và đánh giá chất lượng không khí nói chung, tuỳ thuộc vào các chỉ định thực hiện kiểm tra không khí tại khoa phòng nào.*

## 1. MỤC ĐÍCH

Dùng kiểm tra chất lượng không khí phòng mổ của các bệnh viện. Cũng có thể dùng kiểm tra chất lượng không khí tại các bệnh phòng trong các chương trình kiểm soát nhiễm trùng tại bệnh viện.

## 2. CÁC PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA VI SINH KHÔNG KHÍ

Có nhiều phương pháp:

- Phương pháp hút bụi qua màng lọc bằng gelatin (dùng màng lọc của hãng Sartorius), sau đó đặt màng lọc này lên mặt môi trường, ủ trong điều kiện thích hợp (37°C/khí trường thường hay khí trường $CO_2$ nếu là thạch máu/24 giờ). Sau đó đọc kết quả đếm số lượng khóm vi khuẩn mọc để tính ra số lượng vi sinh trong thể thích không khí được hút qua màng lọc.
- Phương pháp hút bụi trực tiếp lên mặt hộp thạch môi trường dinh dưỡng đặt trong máy hút (dùng máy MAS100 của Merck), hộp thạch sau đó được lấy ra khỏi máy và ủ trong điều kiện thích hợp (37°C/khí trường thường hay khí trường $CO_2$ nếu là thạch máu/24 giờ). Đọc kết quả đếm số lượng khóm vi khuẩn mọc để tính ra số lượng vi sinh trong thể thích không khí được hút qua máy.

- Phương pháp lắng bụi của Koch dựa trên nguyên tắc để bụi lắng trên mặt các hộp thạch dinh dưỡng trong một thời gian nhất định rồi sau đó ủ các hộp thạch trong điều kiện thích hợp (37°C/khí trường thường hay khí trường $CO_2$ nếu là thạch máu /24 giờ). Đọc kết quả đếm số lượng khóm vi khuẩn mọc để tính ra số lượng vi sinh trong thể thích không khí qua một công thức cho sẵn.

## 3. PHƯƠNG PHÁP LẮNG BỤI CỦA KOCH ĐỂ KIỂM TRA VI SINH KHÔNG KHÍ

### 3.1. Phương pháp thực hiện

Đây là phương pháp được nhiều bệnh viện sử dụng để kiểm tra vi sinh không khí phòng mổ. Thường thì mỗi phòng mổ sẽ được kiểm tra năm cụm, một cụm ở giữa và bốn cụm bốn góc. Mỗi cụm đặt 3 hộp thạch dinh dưỡng loại đường kính 90mm. Ba loại hộp thạch dinh dưỡng đó là: một hộp thạch máu (BA) cho toàn bộ vi khuẩn hiếu khí, một hộp thạch Mac - Conkey (MC) cho trực khuẩn gram [-] dễ mọc và một hộp thạch Sabouraud (SA) cho vi nấm. Tất cả các hộp thạch sẽ được mở nắp lần lượt sau khi được đặt đầy đủ tại 5 vị trí của phòng mổ và để yên trong phòng trong 10 phút; sau đó được đậy nắp lại cũng lần lượt, hộp nào mở nắp trước thì được đậy nắp trước. Tất cả được đem về phòng thí nghiệm và ủ ở các điều kiện thích hợp (37°C/khí trường thường cho các hộp thạch MC và khí trường $CO_2$ cho các hộp thạch BA, riêng hộp thạch SA thì ủ ở nhiệt độ phòng thí nghiệm). Thời gian ủ là 24 giờ, riêng hộp thạch SA thì ủ 48 giờ mới đọc kết quả. Lưu ý là khi thực hiện đặt các hộp thạch kiểm tra vi sinh không khí trong phòng mổ thì các nhân viên thực hiện việc này phải rửa tay và mặc đồ giống hệt phẫu thuật viên để tránh đưa vi trùng tạp nhiễm vào phòng mổ. Thời điểm thực hiện kiểm tra tốt nhất là vào buổi sáng sau khi vận hành hệ thống đèn cực tím và các máy lọc không khí khử trùng phòng mổ và trước khi thực hiện trường hợp mổ đầu tiên.

### 3.2. Phương pháp tính toán kết quả

Đếm số khóm vi khuẩn mọc trên mỗi hộp thạch. Tổng số vi khuẩn /$m^3$ không khí tại mỗi cụm được xác định theo công thức sau:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100}{S \times k}$$

Với: X là tổng số vi khuẩn/$m^3$ không khí tại cụm khảo sát (CFU/$m^3$); A là tổng số khóm vi khuẩn mọc trên ba loại môi trường; S là diện tích của hộp petri chứa môi trường, được xác định bằng công thức $S = \pi R^2$ (R tính bằng cm) = 3.1416 x $9^2$; k là hệ số và phụ thuộc vào thời gian đặt hộp thạch (là 1 nếu đặt 5 phút, là 2 nếu đặt 10 phút, là 3 nếu đặt 15 phút).

Ví dụ nếu trên BA chúng ta đếm có 32 khóm, trên MC đếm có 2 khóm, trên SA đếm có 10 khóm; vậy thì A sẽ là 32 + 2 + 12 = 46. Nếu thời gian đặt hộp thạch là 10, và hộp thạch có đường kính 90mm (9cm) thì X sẽ là:

$$X = \frac{46 \times 100 \times 100}{63,62 \times 2} = 3615 CFU/m^3$$

Số lượng vi sinh có trong $1m^3$ không khí trong phòng được tính bằng số trung bình cộng của số lượng vi sinh có trong $1m^3$ của 5 cụm khảo sát. Căn cứ vào kết quả số vi sinh có trong $1m^3$ không khí của phòng, có thể đánh giá chất lượng không khí dựa theo tiêu chuẩn của V. Omelanskii (Nga) sau đây:

**Bảng 17:** Tiêu chuẩn đánh giá chất lượng không khí phòng mổ theo V. Omelanski (Nga)

| Số lượng vi sinh/$m^3$ không khí | Chất lượng không khí |
|---|---|
| <312 (<5 khuẩn lạc 5 /3 đĩa thạch) | Tốt |
| 312 – 1250 (5 – 20 khuẩn lạc/3 đĩa thạch) | Khá |
| 1250 → 1562 (20 – 25 khuẩn lạc/3 đĩa thạch) | Vừa |
| > 1562 (>25 khuẩn lạc/3 đĩa thạch) | Kém |

## 4. TIÊU CHUẨN VI SINH KHÔNG KHÍ

Cho đến hiện nay chúng ta chưa có tiêu chuẩn qui định chất lượng không khí dựa theo lượng vi sinh vật trong $1m^3$ không khí. Sau đây là vài tiêu chuẩn dùng để tham khảo:

- Theo Preobran (Pháp), không khí sạch khi có số lượng vi khuẩn $\leq 1000 CFU/m^3$
- Theo Ginokova (Nga), không khí sạch khi chỉ có 5 – 10 khóm mọc trên mặt thạch để trong 10 phút; vừa khi có 20 – 25 khóm; xấu khi có >25 khóm.
- Theo Romanovic, trong cơ sở sản xuất thực phẩm, không khí rất tốt khi chỉ có < 20 khóm mọc trên mặt thạch để trong 10 phút và không có khúm nấm mốc; tốt khi có 20 – 50 khóm và 2 khóm nấm mốc; vừa khi có 50 – 70 khóm và 5 khóm nấm mốc; xấu khi có >70 khóm vi khuẩn và >5 khóm nấm mốc.

## 5. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết các phương pháp có thể dùng để kiểm tra không khí.

b. Trình bày phương pháp lắng bụi để kiểm tra không khí phòng mổ và tiêu chuẩn để đánh giá chất lượng không khí phòng mổ.

c. Cho biết các tiêu chuẩn hiện nay dùng để đánh giá chất lượng không khí.

# BÀI 18. THỬ NGHIỆM HUYẾT THANH HỌC

**MỤC TIÊU**

1. *Biết được mục đích của các thử nghiệm huyết thanh học, nhờ đó phân tích được ý nghĩa hữu dụng lâm sàng của các thử nghiệm huyết thanh học.*
2. *Biết được các cách biện luận kết quả các xét nghiệm huyết thanh học, nhờ đó có thể thêm các bình luận đi kèm kết quả xét nghiệm để lâm sàng phân tích và sử dụng đúng kết quả xét nghiệm trong chẩn đoán phát hiện tác nhân gây bệnh.*

## 1. MỤC ĐÍCH CỦA THỬ NGHIỆM HUYẾT THANH HỌC

Thử nghiệm huyết thanh học có mục đích tìm kháng thể đặc hiệu một loại kháng nguyên của vi sinh vật gây bệnh có trong huyết thanh bệnh nhân, nhờ đó có thể gián tiếp xác định được tác nhân vi sinh vật gây bệnh. Ví dụ: thử nghiệm Widal chẩn đoán bệnh thương hàn, thử nghiệm tìm HBsAg để xác định bệnh nhân có kháng thể đặc hiệu viêm gan B.

## 2. BIỆN LUẬN KẾT QUẢ MỘT THỬ NGHIỆM HUYẾT THANH HỌC

Vì mục đích là tìm kháng thể đặc hiệu kháng nguyên vi sinh vật nên thử nghiệm huyết thanh học không phải là thử nghiệm trực tiếp phát hiện tác nhân vi sinh vật gây bệnh. Do vậy, biện luận thử nghiệm huyết thanh học phải dựa vào giá trị định lượng của kết quả thử nghiệm.

Kết quả định lượng của một thử nghiệm huyết thanh học thường được hiển thị bằng hiệu giá kháng thể đặc hiệu, tức là độ pha loãng cao nhất của huyết thanh bệnh nhân mà thử nghiệm vẫn còn dương tính (ví dụ trong thử nghiệm Widal, kết quả cho biết TO là 1/100, có nghĩa là huyết thanh bệnh nhân pha loãng 1/100 vẫn còn tụ được với kháng nguyên O của *S. typhi* thử nghiệm). Hiện nay, với một số bộ thử nghiệm ELISA, kết quả định lượng thường được hiển thị bằng giá trị OD nếu thực hiện thử nghiệm trên một độ pha loãng huyết thanh bệnh nhân.

Có nhiều cách biện luận kết quả của thử nghiệm huyết thanh học dựa vào giá trị định lượng để nhờ đó có thể phát hiện được tác nhân vi sinh vật gây bệnh:

### 2.1. Dựa vào huyết thanh kép

- Thử nghiệm trên huyết thanh lấy 2 lần cách nhau 7-14 ngày.
- Kết quả [+] khi hiệu giá huyết thanh lần 2 cao ≥ 4 lần hiệu giá huyết thanh lấy lần 1. Đối với các kết quả định lượng hiển thị bằng giá trị OD thì các nhà sản xuất thường đưa ra một công thức tính toán để cho biết như thế nào là có sự gia tăng có ý nghĩa giá trị định lượng của huyết thanh lần hai so với huyết thanh lần một.

- Phương pháp huyết thanh kép thường ít hữu dụng cho lâm sàng do mất thời gian tính, nhưng rất có ý nghĩa để chẩn đoán xác định.

### 2.2. Dựa vào hiệu giá kháng thể đặc hiệu thuộc lớp IgM

- Có thể chỉ cần thử nghiệm trên huyết thanh lấy một lần và xác định kháng thể đặc hiệu là thuộc lớp IgM, là lớp globulin miễn dịch chỉ xuất hiện trong giai đoạn sớm của bệnh, tồn tại khi có hiện diện tác nhân vi sinh vật gây bệnh trong cơ thể và biến mất nhanh sau khi hết bệnh - không còn hiện diện vi sinh vật gây bệnh trong cơ thể.
- Kết quả được coi là [+], tức là có sự hiện diện tác nhân vi sinh vật gây bệnh trong cơ thể khi hiệu giá kháng thể hay giá trị OD của kết quả thử nghiệm cao hơn hiệu giá hay giá trị OD cắt, tức là hiệu giá hay giá trị OD trung bình của người bình thường.
- Xét nghiệm phát hiện kháng thể đặc hiệu thuộc lớp IgM rất hữu dụng cho lâm sàng do không mất thời gian tính và rất có ý nghĩa để chẩn đoán phát hiện tác nhân vi sinh vật gây bệnh mà không cần phải thử nghiệm trên huyết thanh lấy lần hai. Tuy nhiên, chỉ có các thử nghiệm miễn dịch như ELISA, IFA (miễn dịch huỳnh quang), RIA (miễn dịch phóng xạ) mới có thể xác định được kháng thể đặc hiệu là thuộc lớp nào.

### 2.3. Dựa vào hiệu giá kháng thể đặc hiệu so với giá trị cắt

- Phải xác định hiệu giá hay giá trị OD cắt của quần thể bằng một điều tra huyết thanh dịch tễ học.
- So sánh hiệu giá hay giá trị OD của huyết thanh thử nghiệm với hiệu giá hay giá trị OD cắt của quần thể; nếu hiệu giá huyết thanh thử nghiệm cao $\geq 4$ lần hiệu giá cắt, hay OD huyết thanh thử nghiệm cao hơn k x OD giá trị cắt (k là trị số do nhà sản xuất bộ thử nghiệm qui định) thì có thể cho kết quả [+] tức là cho chẩn đoán xác định tác nhân vi sinh vật gây bệnh.
- Kết quả này khá hữu dụng cho lâm sàng do không mất thời gian tính, tuy nhiên chỉ có ý nghĩa vừa phải để chẩn đoán xác định.

## 3. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết mục đích của thử nghiệm huyết thanh học.

b. Thử nghiệm huyết thanh học trên huyết thanh kép là như thế nào? Tại sao phải làm thử nghiệm huyết thanh học trên huyết thanh kép? Làm thế nào để biện luận kết quả?

c. Thử nghiệm huyết thanh học tìm kháng thể thuộc lớp IgM đặc hiệu kháng nguyên vi sinh vật gây bệnh có ý nghĩa như thế nào trong chẩn đoán phát hiện tác nhân gây bệnh?

d. Có khi nào chúng ta chỉ cần dựa vào kết quả của thử nghiệm huyết thanh học trên huyết thanh bệnh nhân chỉ lấy có một lần mà vẫn có thể chẩn đoán được tác nhân gây bệnh, không cần phải xác định kháng thể đặc hiệu tìm được là thuộc lớp IgM?

# BÀI 19. THỬ NGHIỆM HOÁ MIỄN DỊCH HỌC

**MỤC TIÊU**

1. *Biết được mục đích của các thử nghiệm hoá miễn dịch học, nhờ đó phân tích được ý nghĩa hữu dụng lâm sàng của các thử nghiệm hoá miễn dịch học.*
2. *Biết được các cách biện luận kết quả các xét nghiệm hoá miễn dịch học, nhờ đó có thể thêm các bình luận đi kèm kết quả xét nghiệm để lâm sàng phân tích và sử dụng đúng kết quả xét nghiệm trong chẩn đoán phát hiện tác nhân gây bệnh.*

## 1. MỤC ĐÍCH THỬ NGHIỆM HOÁ MIỄN DỊCH HỌC

Mục đích các thử nghiệm hoá miễn dịch học là phát hiện kháng nguyên của tác nhân vi sinh vật trong bệnh phẩm, nhờ đó có thể chẩn đoán xác định được một cách tương đối trực tiếp tác nhân vi sinh vật gây bệnh. Ví dụ thử nghiệm phát hiện kháng nguyên hoà tan các vi khuẩn thường gây viêm màng não mủ bằng bộ thuốc thử tụ latex có tên Meningitex là một thử nghiệm hoá miễn dịch; thử nghiệm phát hiện kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (tìm HBsAg) trong huyết thanh để phát hiện tình trạng nhiễm viêm gan siêu vi B là thử nghiệm hoá miễn dịch học mặc dù bệnh phẩm để thử là huyết thanh bệnh nhân; hay thử nghiệm tụ trên kính vi khuẩn *Shigella spp.* phân lập được với kháng huyết thanh đặc hiệu để định nhóm A, B, C, và D cũng là thử nghiệm hoá miễn dịch học; hay thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện *Chlamydia trachomatis* trong phết cổ tử cung là thử nghiệm hoá miễn dịch.

## 2. CÁC LOẠI THỬ NGHIỆM HOÁ MIỄN DỊCH

Tuỳ thuộc vào kháng nguyên được phát hiện, có hai loại thử nghiệm hoá miễn dịch, đó là:

### 2.1. Phát hiện kháng nguyên hòa tan

Thường, các thử nghiệm như tụ latex, ELISA, CCIE (Counter Current Immuno-Electrophoresis = điện di miễn dịch đối lưu), là các thử nghiệm hay được dùng để phát hiện kháng nguyên hoà tan có trong bệnh phẩm.

Đối với tụ latex, thường các nhà nghiên cứu hay sản xuất gắn kháng thể đặc hiệu kháng nguyên lên trên các hạt latex bằng polystyren, nhờ vậy khi gặp kháng nguyên đặc hiệu thì các hạt latex sẽ tụ lại và kết quả sẽ thấy được rất dễ dàng bằng mắt thường. Đối với thử nghiệm ELISA, các nhà nghiên cứu hay sản xuất thường phủ kháng thể đặc hiệu kháng nguyên trên các giếng ELISA bằng polystyren nhờ

vậy sẽ tóm bắt được kháng nguyên trong bệnh phẩm (gọi là kỹ thuật ELISA tóm bắt kháng nguyên). Đối với thử nghiệm CCIE, các nhà nghiên cứu hay sản xuất thường cho kháng thể đặc hiệu kháng nguyên vào một giếng và bệnh phẩm vào một giếng đối diện trên thạch điện di, sau đó điện di để kháng thể di chuyển về phía cực âm hướng về giếng chứa bệnh phẩm và kháng nguyên trong bệnh phẩm sẽ di chuyển về phía cực dương hướng về giếng chứa kháng thể; nhờ vậy sự gặp gỡ kháng nguyên - kháng thể sẽ hình thành một vạch kết tủa thấy được trên thạch giữa hai giếng.

Thử nghiệm phát hiện kháng nguyên hoà tan các vi khuẩn thường gây viêm màng não mủ như *N. meningitidis, H. influenzae,* và *S. pneumoniae* bằng phản ứng tụ latex với thuốc thử MENINGITEX; hay thử nghiệm phát hiện Rotavirus trong phân bằng kỹ thuật CCIE; hoặc thử nghiệm phát hiện HBsAg bằng kỹ thuật ELISA tóm bắt kháng nguyên là những minh hoạ ba phương pháp nói trên dùng phát hiện kháng nguyên hoà tan.

### 2.2. Phát hiện kháng nguyên hữu hình

Thường, các thử nghiệm như miễn dịch huỳnh quang trực tiếp (Direct-Immuno-Fluorescent), hay nhuộm kháng thể gắn men peroxidase (Immuno-Peroxidase-Staining), là các thử nghiệm hay được dùng nhất.

Trong thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, bệnh phẩm được phết trên lam kính hiển vi, sau khi để khô được cố định bằng aceton. Nhỏ kháng thể đặc hiệu kháng nguyên vi sinh vật muốn tìm và đã gắn huỳnh quang (thường là FITC = Fluorescent Thio Cyanat) lên phết bệnh phẩm này, sau đó soi dưới kính hiển vi huỳnh quang. Nếu trong bệnh phẩm có vi sinh vật muốn tìm thì vi sinh vật này sẽ bị bám kháng thể đặc hiệu gắn huỳnh quang, do vậy sẽ bị phát huỳnh quang và người làm xét nghiệm sẽ dễ dàng thấy được hình ảnh các vi sinh vật bị phát huỳnh quang này trên một nền tối không phát huỳnh quang.

Thử nghiệm nhuộm kháng thể gắn men cũng có những bước thực hiện giống như nhuộm kháng thể huỳnh quang, nhưng không cần phải quan sát phết bệnh phẩm qua kính huỳnh quang mà chỉ cần qua kính hiển vi quang học thường. Nếu phết bệnh phẩm có chứa kháng nguyên vi sinh vật muốn tìm thì sẽ bị kháng thể gắn men bám vào và sẽ bị sinh màu kết tủa do tác động của men trên đài chất sinh màu.

Thử nghiệm nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* trong các quệt cổ tử cung, phát hiện các vi khuẩn không điển hình trong mẫu đờm là những thử nghiệm hiện nay thường được dùng để chẩn đoán phát hiện các tác nhân gây bệnh nói trên vì phương pháp nuôi cấy khó có thể thực hiện được tại các phòng thí nghiệm lâm sàng.

## 3. BIỆN LUẬN KẾT QUẢ MỘT THỬ NGHIỆM HOÁ MIỄN DỊCH HỌC

Vì mục đích là phát hiện có hay không kháng nguyên vi sinh vật gây bệnh trong bệnh phẩm nên thử nghiệm hoá miễn dịch học thường chỉ cần là thử nghiệm định tính, xác định có (dương) hay không có (âm), mà không cần giá trị định lượng. Vì vậy khi trả lời kết quả thử nghiệm hoá miễn dịch, người làm xét nghiệm không

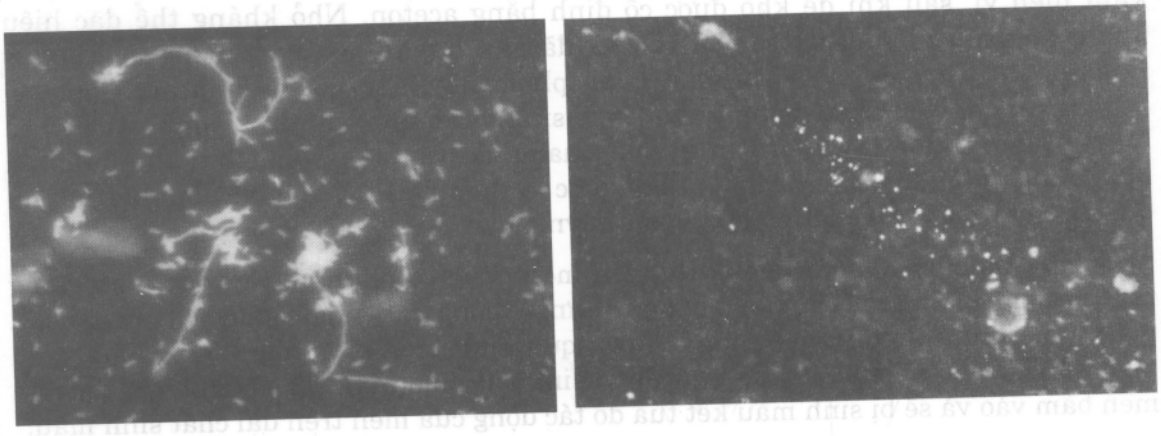
cần thiết phải trả lời con số định lượng. Mặc dù hiện nay với nhiều thử nghiệm hoá miễn dịch dựa trên phản ứng ELISA, kết quả phải đọc bằng máy quang phổ với giá trị OD, nhưng giá trị OD này chỉ cần cho người làm xét nghiệm để so với OD nền nhờ đó biết được kết quả mẫu bệnh phẩm là [+] hay [-]. Khi trả lời kết quả cho lâm sàng, không cần thiết phải đưa kết quả giá trị OD của thử nghiệm vì nếu làm vậy có đôi khi làm rối trí lâm sàng hay có khi lâm sàng hiểu nhầm trị số OD càng lớn thì nhiễm trùng càng nặng so với kết quả có trị số OD nhỏ hơn.

## 4. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết mục đích của thử nghiệm hoá miễn dịch học.

b. Các thử nghiệm nào thường được dùng để phát hiện kháng nguyên hoà tan và kháng nguyên hữu hình các vi sinh vật gây bệnh có trong bệnh phẩm? Nói qua nguyên tắc của các thử nghiệm này và cho các ví dụ minh họa.

c. Hãy cho biết có khi nào thử nghiệm hoá miễn dịch cho chúng ta kết quả có giá trị định lượng không? Nếu có, người làm xét nghiệm có cần thiết phải trả lời cho lâm sàng kết quả thử nghiệm hoá miễn dịch học với kết quả định lượng đi kèm theo hay không? Tại sao cần? Tại sao không cần?



**Hình 19:** Quan sát qua kính hiển vi huỳnh quang phết quệt cổ tử cung nhuộm kháng thể huỳnh quang đặc hiệu *C.trachomatis* (trái) và phết đờm nhuộm kháng thể huỳnh quang đặc hiệu Legionella pneumophila (phải)

# PHỤ LỤC

## Sản phẩm liên quan: TYPHELISAM - Bộ thuốc thử LISA phát hiện và định lượng kháng thể IgM đặc hiệu Salmonella typhi để chẩn đoán phát hiện sớm thương hàn

### Nguyên tắc hoạt động

Bộ thuốc thử hoạt động bằng nguyên tắc của phản ứng ELISA gián tiếp phát hiện kháng thể: kháng nguyên *S. typhi* đã gắn trong các giếng nhựa polystyren tóm bắt các kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh người và sau đó phát hiện kháng thể đặc hiệu bám trên kháng nguyên và xác định kháng thể này thuộc lớp IgM bằng cộng hợp kháng IgM người đánh dấu men peroxidase. Sản phẩm này là kết quả nghiên cứu của CN. Phạm Thái Bình dưới sự hướng dẫn của TS. BS. Phạm Hùng Vân với sự tài trợ của chương trình vườn ươm của Thành Đoàn và của công ty Nam Khoa.

### Trình bày

Có các thành phần sau đây, tất cả giữ ở 4°C

- R1: bản nhựa polystyren làm ELISA, với 12 thanh rời, mỗi thanh có 8 giếng, các giếng này đã được phủ kháng nguyên trích từ *S. typhi*.
- R2: dung dịch rửa PBS -T, 100ml x 4.
- R3: dung dịch pha loãng PBS -T-BSA, 120ml x 1.
- R4: cộng hợp là kháng thể kháng IgM người gắn men peroxidase (HRPO), 12ml.
- R5a: cơ chất TMB, 0,65ml x 1 tube
- R5b: peroxid UPR, 0,65ml x 1
- R5c: dung dịch đệm cơ chất, 12ml x 1.
- R6: dung dịch ngưng phản ứng, 12ml x 1
- R7a: huyết thanh chứng (+), 0,1ml x 1
- R7b: huyết thanh chứng (-), 0,1ml x 1
- R7c: huyết thanh chuẩn, 0,1ml x 1

### Tiến hành phản ứng

- Pha loãng huyết thanh chứng [+], chứng [-], chuẩn và các huyết thanh thử nghiệm 1/160 trong các tube eppendorf (10µl huyết thanh cho vào 1590µl R2). Cho vào các giếng, mỗi giếng 100µl các huyết thanh đã pha loãng này. Ủ 37°C trong 30 phút.

- Rửa giếng 4 lần với R2, ngâm 1 phút ở lần rửa cuối. Lưu ý phải giũ sạch sau mỗi lần đổ bỏ dung dịch rửa.
- Cho vào các giếng 100µl cộng hợp, gãi nhẹ đáy giếng để trộn đều. Ủ 37°C trong 30 phút.
- Rửa giếng 4 lần với R2, ngâm 1 phút ở lần rửa cuối. Lưu ý phải giũ sạch sau mỗi lần đổ bỏ dung dịch rửa.
- Pha 1ml cơ chất trong một tube Eppendorf bằng cách hút 0.9ml R5c cho vào tube rồi thêm và 50µl R5a và 50µl R5c. Lắc trộn thật đều. Dung dịch này chỉ pha ngay sau khi hoàn tất bước 4.
- Cho vào các giếng, mỗi giếng 100µl cơ chất vừa chuẩn bị xong. Giữ trong tối trong 15 phút. Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 450nm.

**Đọc kết quả**

- Xác định giá trị $OD_{450}$ của điểm cắt bằng cách lấy giá trị $OD_{450}$ của chứng chuẩn đo được (OF) nhân với giá trị $OD_{450}$ của chứng chuẩn (CF) ghi trong tài liệu hướng dẫn kèm theo bộ thử nghiệm.
- Xác định các chỉ số kháng thể của huyết thanh chứng [+] chứng [-] và các huyết thanh thử nghiệm bằng cách lấy giá trị $ODv_{50}$ đo được trên các mẫu chia cho giá trị $OD_{450}$ của điểm cắt.
- Biện luận như sau:
  + Chỉ số kháng thể của huyết thanh chứng [+] phải $p > 1,05$, của huyết thanh chứng [-] phải $p < 0,95$.
  + Các mẫu huyết thanh thử có chỉ số kháng thể > 1,05 là dương tính, < 0,95 là âm tính.
  + Các mẫu huyết thanh thử có chỉ số kháng thể từ 0,95 đến 1,05 thì có thể dương tính và cũng có thể là âm tính. Cần phải làm lại trên mẫu lấy sau đó một tuần mới quyết định được.

# BÀI 20. ĐÁNH GIÁ MỘT THỬ NGHIỆM DÙNG ĐỂ PHÁT HIỆN MỘT TÁC NHÂN GÂY BỆNH

**MỤC TIÊU**

1. *Định nghĩa được chuẩn vàng để có thể dùng làm chuẩn đánh giá một xét nghiệm đang dùng hay sắp triển khai trong phòng thí nghiệm.*
2. *Tính được độ nhạy cảm (Se) độ đặc hiệu (Sp) của một xét nghiệm để có thể tính toán, phân tích và biết được ý nghĩa của hai trị số này khi đánh giá một xét nghiệm đang dùng hay sắp triển khai dùng.*
3. *Tính được giá trị tiên đoán dương (PPV), giá trị tiên đoán âm (NPV) để có thể giúp các nhà lâm sàng đánh giá được sự hữu dụng lâm sàng của kết quả xét nghiệm và đồng thời cho được chỉ định xét nghiệm có hiệu quả nhất trong chẩn đoán bệnh.*
4. *Tính được hệ số kappa để có thể ứng dụng trong đánh giá độ phù hợp của hai thử nghiệm khác nhau dùng cho cùng một mục đích phát hiện tác nhân vi sinh vật gây bệnh.*
5. *Tính được hệ số biến thiên (CV) để có thể phân tích được độ lặp lại của một xét nghiệm đang dùng hay sắp triển khai trong phòng thí nghiệm.*

## 1. CHUẨN VÀNG LÀ GÌ?

Để đánh giá một thử nghiệm được nghiên cứu dùng phát hiện một tác nhân gây bệnh, người ta phải so sánh thử nghiệm này với chuẩn vàng (gold standard). Chuẩn vàng là tiêu chuẩn dùng để xác định bệnh thật sự và không bệnh thật sự. Chuẩn vàng có thể chỉ cần dựa vào một xét nghiệm, một dấu chứng lâm sàng, hay phải dựa vào sự kết hợp nhiều dấu hiệu xét nghiệm và dấu chứng lâm sàng; nhưng quan trọng nhất là phải được nhiều người thừa nhận trên y văn.

## 2. ĐỘ NHẠY CẢM VÀ ĐỘ ĐẶC HIỆU CỦA THỬ NGHIỆM

Đối với các nhà nghiên cứu sản xuất bộ thử nghiệm hay đối với các phòng thí nghiệm áp dụng bộ thử nghiệm, có hai thông số cần phải được đánh giá, đó là độ nhạy cảm và độ đặc hiệu của thử nghiệm.

- Độ nhạy cảm (sensitivity = Se) của thử nghiệm là tỷ lệ phần trăm cho kết quả [+] trong số những mẫu bệnh thật sự.
- Độ đặc hiệu (specificity = Sp) của thử nghiệm là tỷ lệ phần trăm cho kết quả [-] trong số những mẫu không bệnh thật sự.

Ví dụ: Để nghiên cứu Se và Sp của thử nghiệm ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu chẩn đoán lao phổi, nhà nghiên cứu thử trên 100 mẫu huyết thanh bệnh nhân bị lao (xác định bằng chuẩn vàng là nuôi cấy đờm [+] vi khuẩn *M. tuberculosis* hay phết nhuộm kháng acid mẫu đờm [+] kèm X quang phổi thấy tổn thương thâm nhiễm đỉnh phổi điển hình lao); và 100 mẫu huyết thanh bệnh nhân được xác định bị viêm phổi do tác nhân vi khuẩn khác và loại trừ nhiễm lao. Kết quả được trình bày trong bảng sau:

**Bảng 20.1:** Ví dụ kết quả thử nghiệm ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu để chẩn đoán lao.

| | Bệnh nhân lao phổi [+] | Bệnh nhân lao phổi [-] | Tổng |
|---|---|---|---|
| ELISA [+] | a = 75 | b = 30 | a+b = 105 |
| ELISA [-] | c = 25 | d = 70 | c+d = 95 |
| Tổng | a+c = 100 | b+d = 100 | a+b+c+d = 200 |

- Độ nhạy cảm của thử nghiệm ELISA là:

$$Se = \frac{a}{a + c} = \frac{75}{75 + 25} = 75\%$$

- Độ đặc hiệu của thử nghiệm ELISA là:

$$Sp = \frac{d}{b + d} = \frac{70}{30 + 70} = 70\%$$

## 3. GIÁ TRỊ TIÊN ĐOÁN DƯƠNG VÀ GIÁ TRỊ TIÊN ĐOÁN ÂM CỦA THỬ NGHIỆM

Đối với các nhà lâm sàng hay điều trị thì giá sử dụng của một thử nghiệm là phải trả lời được hai câu hỏi: (1) Nếu thử nghiệm có kết quả [+] thì tỷ lệ chính xác để kết luận được bệnh nhân bị bệnh là bao nhiêu phần trăm? Thông số này được gọi là giá trị tiên đoán dương (PPV = Positive predictive value). (2) Nếu kết quả thử ngiệm là [-] thì tỷ lệ chính xác để kết luận bệnh nhân không bị bệnh là bao nhiêu phần trăm? Thông số này được gọi là giá trị tiên đoán âm (NPV = Negative predictive value). Nếu dựa vào kết quả trình bày trong bảng 12 ở trên thì giá trị tiên đóan dương (PPV) và giá trị tiên đoán âm (NPV) của thử nghiệm ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu *M. tuberculosis* để chẩn đoán lao sẽ là:

$$PPV = \frac{a}{a + b} = \frac{75}{75 + 30} = 71\%$$

$$NPV = \frac{d}{c + d} = \frac{70}{25 + 70} = 74\%$$

Tuy nhiên, nếu chúng ta tính PPV và NPV của thử nghiệm ELISA dựa trên kết quả nghiên cứu trên một số lượng mẫu âm hay mẫu dương biết trước như trên

thì sẽ không nói được xét nghiệm ELISA hữu dụng như thế nào khi đem ra áp dụng trên từng thực tế. Lấy ví dụ, nếu chúng ta dùng thử nghiệm ELISA này để tầm soát lao trên một khu vực dân cư có tỷ lệ mắc bệnh lao là 1/10000 thì nếu kết quả ELISA [+], độ chính xác để xác định nhiễm lao trên người được làm thử nghiệm sẽ là bao nhiêu ủ (tức là PPV); và nếu kết quả ELISA [-] thì độ chính xác để xác định không bị nhiễm lao trên người được làm thử nghiệm sẽ là bao nhiêu (tức là NPV) sẽ là bao nhiêu? Sau đây là cách tính: Nếu khu vực dân cư này có 1000000 người, thì số người mắc bệnh lao sẽ là 100 người, số người không mắc lao sẽ là 999900 người. Vì độ nhạy của thử nghiệm là 75% nên trên trên 100 người mắc lao này, thử nghiệm sẽ cho kết quả [+] trên 75 người, vì độ đặc hiệu của thử nghiệm là 70% nên trên 999900 người không bị nhiễm lao này sẽ có 699930 người cho kết quả ELISA [-] và 299970 cho kết quả ELISA [+]. Các số liệu được trình bày vào bảng dưới đây:

**Bảng 20.2:** Ví dụ kết quả thử nghiệm ELISA tầm soát lao, giả định thực hiện được trên tất cả 1000000 người trong quần thể có tỷ lệ mắc lao là 1/10000.

| | **Bệnh nhân lao phổi [+]** | **Bệnh nhân lao phổi [-]** | **Tổng** |
|---|---|---|---|
| ELISA [+] | a = 75 | b = 299970 | a+b = 300045 |
| ELISA [-] | c = 25 | d = 699930 | c+d = 699955 |
| Tổng | 100 | 999900 | 1000000 |

PPV và NPV của thử nghiệm ELISA phát hiện lao ứng dụng trên các đối tượng này là:

$$PPV = \frac{a}{a+b} = \frac{75}{300045} = 0{,}02\%$$

$$NPV = \frac{d}{c+d} = \frac{699930}{699955} = 9999\%$$

Tính toán trên chứng minh là nếu kết quả ELISA [+], khả năng xác định bị nhiễm lao trên người được thử nghiệm chỉ là 0,02%, còn nếu kết quả ELISA [-] thì khả năng xác định không bị nhiễm lao trên người thử nghiệm là đến 9999%. Có nghĩa là với độ nhạy 75% và độ đặc hiệu 70% thì ELISA cho kết quả [-] có giá trị hơn nhiều so với ELISA cho kết quả [+] trong mục đích sử dụng để tầm soát lao trên người bình thường ở quần thể dân cư trên.

Như vậy, sự hữu dụng của một xét nghiệm đối với bác sĩ lâm sàng hay đối với nhà điều trị tuỳ thuộc rất nhiều vào xác suất chẩn đoán trước khi cho xét nghiệm. Trong trường hợp ELISA chẩn đoán lao nêu trên, nếu bác sĩ đã nghi ngờ bệnh nhân bị lao (xác suất 50%) thì PPV và NPV sẽ là 71% và 74% như là trong thiết kế thí nghiệm tìm Se và Sp với 50% mẫu nhiễm lao và 50% mẫu không nhiễm lao, nhưng nếu chỉ cho xét nghiệm cầu may thì PPV sẽ rất thấp chỉ 0,02% vì lúc đó xác suất chẩn đoán lao tiền xét nghiệm rất thấp như là trong trường hợp cho xét nghiệm ELISA để tầm soát lao đại trà ở quần thể dân cư trong ví dụ trên.

Tóm lại các nhà lâm sàng hay điều trị thường hay đặt câu hỏi về độ nhạy cảm và độ đặc hiệu của một thử nghiệm mà không biết rằng hai thông số này ít có giá trị hữu dụng đối với họ. Thông số thật sự hữu dụng đối với các nhà lâm sàng hay điều trị chính là PPV và NPV. Hai giá trị này chỉ bị ảnh hưởng một phần bởi độ nhạy và độ đặc hiệu của thử nghiệm, trong khi đó lại bị ảnh hưởng khá lớn bởi xác suất chẩn đoán của bác sĩ trước khi đặt bút yêu cầu xét nghiệm. Nếu độ nghi ngờ bệnh nhân bị mắc bệnh cần chẩn đoán càng cao, thì kết quả xét nghiệm càng hữu dụng cho lâm sàng. Còn nếu chỉ cho xét nghiệm cầu may, thì sự hữu dụng lâm sàng của kết quả xét nghiệm càng thấp.

## 4. SO SÁNH HAI THỬ NGHIỆM KHÁC NHAU CHO CÙNG MỘT MỤC ĐÍCH PHÁT HIỆN TÁC NHÂN VI SINH VẬT GÂY BỆNH

Để so sánh hai xét nghiệm, các thông số sau đây cần được phân tích, đó là: độ tương đồng và độ khác biệt hay còn gọi là độ phù hợp và độ không phù hợp. Cách tính toán dựa vào bảng trình bày sau đây:

**Bảng 20.3:** Ví dụ so sánh kết quả thử nghiệm ELISA và thử nghiệm tụ latex (LAT) phát hiện kháng thể đặc hiệu *M. tuberculosis* trên 100 mẫu huyết thanh lấy thử nghiệm.

| | | Thử nghiệm ELISA | | Tổng |
|---|---|---|---|---|
| | | + | - | |
| Thử nghiệm | + | a = 65 | c = 10 | a+c = 75 |
| LAT | - | b = 10 | d = 15 | b+d = 25 |
| Tổng | | a+b = 75 | c+d = 25 | n = 100 |

*Độ phù hợp quan sát được* (agreement degree) là tỷ lệ % các kết quả mà cả hai thử nghiệm đều cho kết quả giống nhau. *Độ không phù hợp quan sát được* (disagreement degree) là tỷ lệ % các kết quả mà hai thử nghiệm cho kết quả khác nhau. Phân tích bảng trên chúng ta thấy:

- Độ phù hợp quan sát được là:

$$\frac{a+d}{a+b+c+d} = \frac{65+15}{65+10+10+15} = 80\%$$

- Độ không phù hợp quan sát được là:

$$\frac{c+b}{a+b+c+d} = \frac{10+10}{65+10+10+15} = 20\%$$

Tuy là độ phù hợp quan sát được, nhưng không thể dựa vào trị số này để đánh giá mức độ phù hợp của hai xét nghiệm. Các nhà dịch tễ học lâm sàng đã nghiên cứu, đưa ra một thông số, gọi là *hệ số kappa*, dựa vào giá trị của hệ số kappa, phòng thí nghiệm hay các nhà lâm sàng có thể đánh giá độ phù hợp của hai thử nghiệm dựa theo bảng sau:

**Bảng 20.4:** Bảng đánh giá mức độ phù hợp của hai thử nghiệm dựa theo hệ số kappa

| Hệ số kappa | Mức độ phù hợp | Hệ số kappa | Mức độ phù hợp |
|---|---|---|---|
| 0,0 – 0,2 | Quá thấp | 0,6 – 0,8 | Khá |
| 0,2 – 0,4 | Thấp | 0,8 – 1,0 | Cao |
| 0,4 – 0,6 | Vừa | | |

Sau đây là cách tìm hệ số kappa:

- Phù hợp quan sát được, tính như sau:

$$\frac{(a+d)}{n} \times 100$$

- Phù hợp ngẫu nhiên, tính như sau:

$$\left(\frac{(a+b)}{n} \times \frac{(a+c)}{n} \times 100\right) + \left(\frac{(c+d)}{n} \times \frac{(b+d)}{n} \times 100\right)$$

- Phù hợp hoàn toàn, giả định cả hai phù hợp hoàn toàn với nhau, trị số sẽ là 100
- Phù hợp thực tại, tính như sau:

Phù hợp quan sát – Phù hợp ngẫu nhiên

- Phù hợp tiềm ẩn, tính như sau:

Phù hợp hoàn toàn – Phù hợp ngẫu nhiên

Từ các giá trị trên, hệ số kappa được tính theo công thức sau:

$$\text{Hệ số kappa} = \frac{\text{Phù hợp thực tại}}{\text{Phù hợp tiềm ẩn}}$$

Trong ví dụ trình bày ở bảng 20.4, sau khi có được các giá trị của phù hợp ngẫu nhiên (62,5), phù hợp quan sát (100), phù hợp thực tại (17,5) và phù hợp tiềm ẩn (37,5); hệ số kappa sẽ là:

$$\text{Kappa} = \frac{17,5}{37,5} = 0,47$$

Với giá trị của hệ số kappa tính được, chúng ta có thể kết luận ELISA và LAT phát hiện kháng thể đặc hiệu *M. tuberculosis* có độ phù hợp ở mức độ vừa.

Ngoài ra, chúng ta còn có thể phân tích độ phù hợp dương, tức là tỷ lệ % cả hai thử nghiệm đều cho kết quả [+] trong tổng số các kết quả giống nhau của hai xét nghiệm; và độ phù hợp âm là tỷ lệ % cả hai thử nghiệm đều cho kết quả

[-] trong tổng số các kết quả giống nhau của cà hai xét nghiệm. Trong ví dụ trên, chúng ta thấy:

- Độ phù hợp dương của ELISA và LAT là:

$$\frac{a}{a+d} = \frac{65}{65+15} = 81\%$$

- Độ phù hợp âm của ELISA và LAT là:

$$\frac{d}{a+d} = \frac{15}{65+15} = 19\%$$

## 5. ĐỘ LẶP LẠI CỦA XÉT NGHIỆM

Độ lặp lại của kết quả định lượng của xét nghiệm khi làm nhiều lần trên cùng một mẫu bệnh phẩm được gọi là độ lặp lại của xét nghiệm. Thông số nói lên độ lặp lại của một xét nghiệm được gọi là hệ số biến thiên (CV = Coefficient of variation) của kết quả xét nghiệm.

Trên cùng một mẫu bệnh phẩm, nếu chúng ta chia ra để làm cùng một xét nghiệm, và các kết qua định lượng sẽ là $A_1$, $A_2$, $A_3$, $A_4$...$A_n$. Chúng ta sẽ tính được kết quả trung bình A và độ lệch chuẩn σ như sau:

$$\bar{A} = \frac{A_1+A_2+A_3+A_4+...+A_n}{N}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma (A-\bar{A})^2}{N}}$$

Hệ số biến thiên chính là tỷ lệ phần trăm của độ lệch chuẩn so với số trung bình, được tính theo công thức sau:

$$CV = 100x\frac{\sigma}{\bar{A}}\%$$

Hệ số biến thiên còn được gọi là hệ số phân tán, cho biết độ lặp lại của một thử nghiệm có tốt hay không. Thường một thử nghiệm được đánh giá có độ lặp lại tốt khi CV ≤ 10%.

## 6. CÂU HỎI ÔN TẬP

a. Cho biết chuẩn vàng là gì? ý nghĩa của chuẩn vàng trong đánh giá một xét nghiệm.

b. Hãy cho biết cách tính độ nhạy cảm và độ đặc hiệu của một xét nghiệm. ý nghĩa của hai thông số này trong đánh giá xét nghiệm. Với một xét

nghiệm đang sử dụng, làm thế nào để nâng cao độ nhạy cảm hay độ đặc hiệu của xét nghiệm đó?

c. Hãy cho biết cách tính giá trị tiên đoán dương và giá trị tiên đoán âm của một xét nghiệm. Đối với bác sĩ điều trị thì phải làm thế nào để giá trị tiên đoán dương và giá trị tiên đoán âm của một xét nghiệm có giá trị cao nghĩa là xét nghiệm sẽ hữu dụng cao đối với lâm sàng?

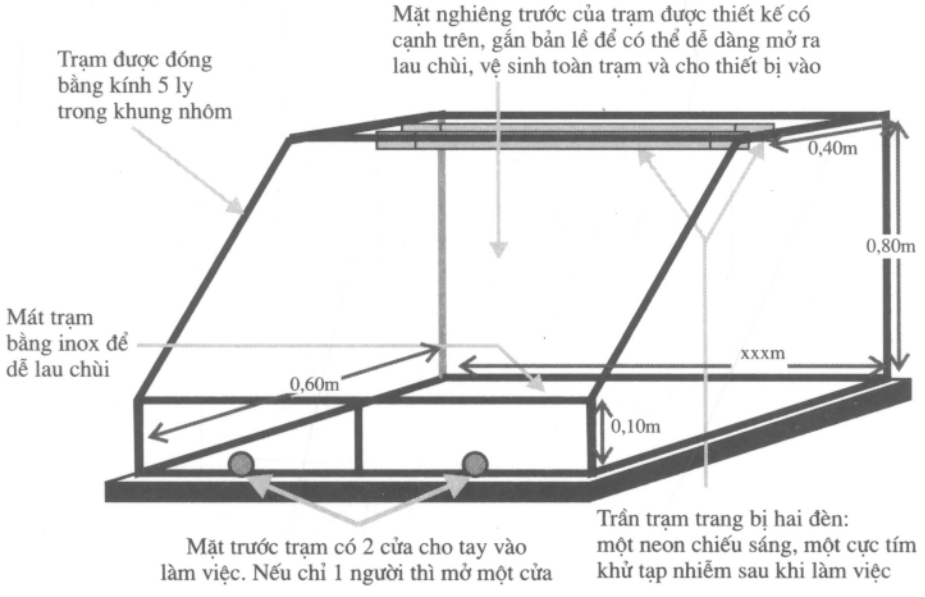
d. Cho biết cách nào để có thể tìm được độ phù hợp của hai xét nghiệm được sử dụng cho cùng một mục đích phát hiện tác nhân vi sinh vật gây bệnh?

e. Cho biết cách nào để có thể đánh giá độ lặp lại của một xét nghiệm?

# BÀI 21. TRANG BỊ CƠ BẢN CHO MỘT PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH LÂM SÀNG

## 1. THIẾT BỊ CƠ BẢN

- Một tủ lạnh 2 ngăn 180L đến 240L, dùng để đựng các môi trường, và các thuốc thử chế sẵn cần phải lưu trữ ở 4°C.
- Một tủ ấm có dung tích 80L đến 100L, điều chỉnh được nhiệt độ từ nhiệt độ +5 hay +10 trên nhiệt độ phòng đến 100°C dùng để làm tủ ủ vi khuẩn.
- Một tủ cấy vi sinh khí tỉnh có đèn neon và đèn UV, kích thước 0,6 x 1,2m.
- Một kính hiển vi quang học thường 2 mắt của Olympus, Nikon, hay của một hãng có uy tín từ Nhật/Âu Mỹ.
- Một máy ly tâm bàn có rotor tương thích cho các tube thí nghiệm hay tube Falcon 15ml (có thể dùng máy ly tâm Trung Quốc).
- Một máy cách thuỷ có thể điều chỉnh nhiệt độ từ 30°C đến 100°C
- Một máy vi tính có kèm máy in dùng để cài đặt phần mềm quản lý xét nghiệm vi sinh lâm sàng (phần mềm SCM của Phạm Thái Bình).




**Hình 21.1:** Mô hình một tủ cấy vi sinh khí tĩnh. Kích thước chiều cao 0,8m, chiều sâu 0,6m. Riêng kích thước chiều dài thì tuỳ thuộc vào bàn để tủ cấy, trung bình là 1,2m.

## 2. DỤNG CỤ CƠ BẢN

- Kim cấy, vòng cấy, và vòng cấy định lượng; mỗi loại cần 2 cái.
- Micropipet điều chỉnh được thể tích từ 1-10µl, 20-200µl, 50-1000µl. Mỗi loại một cây.
- Một bút ngòi thép viết lên kính.
- Hai kẹp mũi nhọn để gắp đĩa kháng sinh.
- Một thước đo đường kính vòng vô khuẩn.
- Hai hộp đựng lam.
- Hai đèn cồn.
- Dầu soi kính hiển vi.
- Một bình thuỷ tinh miệng rộng có nắp, dung tích 3-5L làm bình nến.
- Một giá nhuộm và khay nhuộm.
- Hai ca nhựa 2L có nắp để đựng vật liệu bẩn sau khi dùng xong.
- Hai bình tia dung tích 0,5L để đựng cồn rửa tay
- Giá nhựa đựng ống nghiệm thuỷ tinh và nhựa các loại
- Dụng cụ huỷ kim.
- Bình đựng cồn 20L.
- Một thùng đựng rác y tế.
- Một thùng đựng rác thông thường.
- Hai kéo cắt giấy hay nylon.

## 3. VẬT LIỆU TIÊU HAO

### 3.1. Loại thông thường

- Pipet Pasteur nhựa vô trùng.
- Các hộp dầu côn dùng cho micropipet, gồm các loại côn trắng 1-20µl, côn vàng 20-200µl, côn xanh 50-1000µl. Tất cả đều được vô trùng.
- Lam và lamel soi kính hiển vi.
- Giấy lau kính hiển vi, loại không có bụi giấy.
- Bao nylon màu đen đựng rác y tế.
- Bao nylon trong đựng rác thông thường.
- Băng keo giấy.

- Bút aceton.
- Tăm bông vô trùng làm kháng sinh đồ.

### 3.3. Các bộ thuốc nhuộm

- Bộ thuốc nhuộm gram.
- Bộ thuốc nhuộm kháng acid.
- Bộ thuốc nhuộm Methylen Blue kiềm.
- Bộ thuốc nhuộm Nigrosin.
- Bộ thuốc nhuộm Giemsa.

### 3.4. Các vật liệu lấy và chuyên chở bệnh phẩm

- Tăm bông vô trùng lấy mẫu.
- Tăm bông mảnh vô trùng lấy mẫu.
- Tăm bông que dài vô trùng lấy mẫu quệt cổ tử cung.
- Tube đũa môi trường Stuart –Amies.
- Tube đũa môi trường Cary –Blair.
- Lọ nắp vặn chặt lấy mẫu tạp nhiễm.
- Lọ nắp vặn chặt vô trùng lấy mẫu không tạp nhiễm.
- Lọ nắp vặn chặt có mái chèo.
- Lọ nắp vặn chặt có mái chèo và có túi F2M.
- Tube 1,8ml nắp vặn vô trùng.
- Tube 5ml nắp vặn vô trùng.
- Tube 15ml nắp vặn vô trùng.
- Tube Eppendorf biopure.
- Tube lấy máu không kháng đông.
- Các loại tube lấy máu kháng đông EDTA, citrat, heparin.

### 3.4. Các môi trường phong phú, tăng sinh thông thường và chế sẵn

- GN broth.
- Pepton kiềm.
- Loeffler (huyết tương đông).
- Chai cấy máu 2 pha.

- Chai 2 mặt thạch CA cấy dịch không tạp nhiễm.
- Chai 2 mặt thạch BANg và MC cấy nước tiểu.
- Ống môi trường BHI -XV (tube 5ml nắp vặn).

### 3.5. Các môi trường phân lập thông thường và chế sẵn

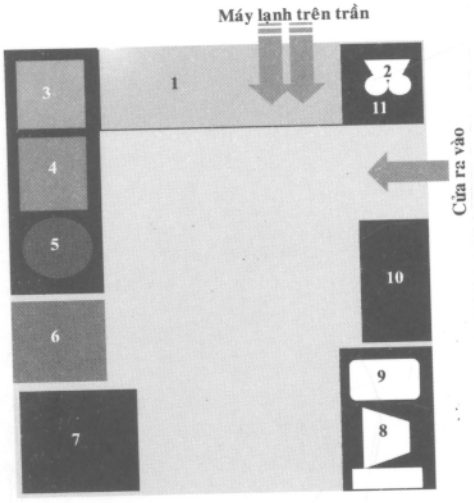
- BA máu cừu
- BANg*
- CAXV
- CAHI
- CATM*
- MC (hay EMB)
- SS (hay XLD, hay HE)
- MEA (hay TCBS)*
- BA có tellurite *
- BAYK**
- Campy-BAP***

### 3.6. Các kit định danh

- IDS 14GNR, hay một số các đĩa giấy sinh hoá lẻ, hay một số ống môi trường sinh hoá lẻ
- SAU-latex
- Đĩa bacitracin
- Đĩa optochin
- Que X, V, XV
- Đĩa novobiocin
- Đĩa oxidase
- $H_2O_2$ 3%
- Bile Esculin
- TSB có 6,5% NaCl
- RNIS định danh *Neisseria*
- Tube KIA hay TSI

### 3.7. Các môi trường làm kháng sinh đồ

- MHA
- MHBA
- HTM*




1. Tủ cấy vi sinh khí tĩnh
2. Kính hiển vi 2 mắt
3. Lavabo rửa tay và nhuộm lam
4. Máy cách thuỷ
5. Máy ly tâm bàn
6. Tủ ấm 80-100L
7. Tủ lạnh 180-200L
8. Máy vi tính
9. Máy in
10. Tủ đựng hồ sơ
11. Kệ đá có ngăn tủ bên dưới

**Hình 21.2:** Mô hình một phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng tại bệnh viện (kích thước 3-4m x 4-5m)

### 3.8. Các phương tiện làm kháng sinh đồ

- Lọ nước muối sinh lý vô trùng (2-3ml)
- Các ống độ đục chuẩn 0,5 McF
- Các đĩa kháng sinh làm kháng sinh đồ
- Đĩa nitrocefin tìm β-lactamase

### 3.9. Các vi khuẩn chuẩn và tham chiếu để kiểm tra chất lượng

- *S. aureus* ATCC 25923
- *E. coli* ATCC 25922
- *E. coli* ATCC 35218
- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *S. faecalis* ATCC 29212
- *S. pneumoniae* ATCC 49619
- *H. influenzae* ATCC 49247
- *H. influenzae* ATCC 49278

- *N. meningitidis group B*
- *S. typhi, Shigella flexneri*
- *K. pneumoniae, Proteus vulgaris*
- *N. gonorrhoeae, M. catarrhalis*
- *V. cholerae*

### 3.10. Các môi trường lưu chủng tạm thời

- Ống thạch NA nghiêng trong tube nhựa 5ml nắp vặn chặt
- Ống thạch CAXV nghiêng trong tube nhựa 5ml nắp vặn chặt
- Cryotube chứa BHI có 20% glycerol

## TÀI LIỆU THAM KHẢO


1. **Bailey & Scott' s Diagnostic Microbiology.** 11th Edition. *Betty A. Forbes, Daniel F. Sahm, Alice S. Weissfeld*. Mosby. 2002
2. **Bacterial Pathogenesis - A Molecular Approach.** *Abigail A. Salyers and Dixie D*. Whitt. ASM Press. 1994
3. **Clinical Bacteriology.** *J. Keith Struthers, Roger P. Westran*. Manson Publishing. 2003
4. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.** 5th Edition. *Elmer W. Koneman, Stephen D. Allen, William M. Janda, Paul C. Schreckenberger, Washington C. Winn, Jr*. Lippincott. 1997
5. **Immunobiology - the immune system in health and disease**. 6th Edition. *Charles A. Janeway, Jr., Paul Travers, Mark Walport, Mark J. Shlomchik*. Churchill Levingstone. 2005
6. **Jawetz, Melnick, & Adelberg' s Medical Microbiology**. 23th Edition. *Geo. F. Brooks, Janet S. Butel, Stephen A. Morse*. Mc Graw Hill. 2004
7. **Manual of Clinical Microbiology. 6th Edition**. *Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, Michael A. Pfaller, Fred C. Tenover, Robert H. Yolken*. ASM Press. 1995
8. **Microbial Life.** *Jerome J. Perry, James T. Staley, Stephen Lory*. Sinauer. 2002
9. **Mims' Pathogenesis of Infectious Disease.** 4th Edition. *Cedric Mims, Nigel Dimmock, Anthony Nash, John Stephen*. Academic Press. 1997.
10. **Problem-Oriented Clinical Microbiology and Infection.** *Hilary Humphreys, William L. Irving*. Churchill Livingstone. 1996

# PHỤ LỤC A

## Bảng tra cứu các sơ đồ và qui trình làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng các bệnh phẩm khác nhau


| Sơ đồ | Nội dung | Trang |
|---|---|---|
| 1 | Qui trình vi sinh lâm sàng cấy máu với chai cấy máu hai pha | 17 |
| 2 | Qui trình vi sinh lâm sàng các mẫu mủ và chất dịch | 24 |
| 3 | Qui trình vi sinh lâm sàng khảo sát mẫu phân | 30 |
| 4 | Qui trình vi sinh lâm sàng khảo sát mẫu nước tiểu | 42 |
| 5 | Qui trình vi sinh lâm sàng mẫu dịch não tuỷ | 52 |
| 6 | Qui trình vi sinh lâm sàng khảo sát mẫu quệt hầu họng tìm liên cầu tan huyết beta | 58 |
| 7 | Qui trình vi sinh lâm sàng mẫu mủ tai, mủ xoang, dịch rửa xoang | 66 |
| 8 | Qui trình vi sinh lâm sàng mẫu đờm/dịch hút đờm trên thanh – khí quản/dịch rửa khí quản qua nội soi | 77 |
| 9 | Cách pha loãng và cấy định lượng mẫu đờm trên các hộp thạch | 79 |
| 10 | Qui trình vi sinh lâm sàng các mẫu lấy từ đường sinh dục | 91 |
| 11 | Qui trình vi sinh lâm sàng các mẫu khảo sát kỵ khí | 100 |


# PHỤ LỤC B

## Bảng tra cứu các hình ảnh minh hoạ


| Hình | Nội dung | Trang |
|---|---|---|
| 1 | Hình vẽ minh hoạ cấu tạo chai cấy máu hai pha | 14 |
| 2 | Hình ảnh chai cấy máu 2 pha có vi khuẩn mọc và chưa cấy bệnh phẩm | 16 |
| 3 | Hình ảnh chai cấy máu Ấn Độ | 16 |
| 4 | Hình ảnh tăm bông vô trùng lấy bệnh phẩm | 22 |
| 5 | Hình ảnh cặp tăm bông vô trùng và tăm bông mảnh vô trùng kèm với tube môi trường chuyên chở Stuart -Amies | 22 |
| 6 | Hình ảnh lọ lấy mẫu phân tươi dùng khảo sát vi khuẩn | 29 |
| 7 | Hình ảnh lọ lấy mẫu phân có F2M để tìm ký sinh trùng đường ruột | 29 |
| 8 | Hình ảnh cặp tăm bông vô trùng kèm với tube môi trường chuyên chở Cary -Blair | 29 |
| 9 | Hình ảnh gram vi khuẩn *C. jejuni* | 33 |
| 10 | Hình ảnh khóm vi khuẩn *C. jejuni* mọc trên môi trường phân lập | 33 |
| 11 | Hình vẽ minh hoạ cấu tạo chai cấy nước tiểu 2 mặt thạch | 39 |
| 12 | Hình ảnh các mức độ vi khuẩn mọc trên mặt thạch của chai cấy nước tiểu | 40 |
| 13 | Hình ảnh chai nắp đỏ vô trùng lấy bệnh phẩm | 40 |
| 14 | Hình ảnh chai cấy nước tiểu hai mặt thạch | 40 |
| 15 | Các hình ảnh khảo sát trực tiếp mẫu dịch não tuỷ nhìn qua kính hiển vi | 47 |
| 16 | Hình vẽ minh hoạ cấu tạo chai 2 mặt thạch để cấy dịch não tủy | 48 |
| 17 | Hình vẽ minh hoạ cách làm thử nghiệm với bộ thuốc thử MENINGITEX phát hiện kháng nguyên hoà tan các vi khuẩn thường gây VMNM | 50 |
| 18 | Hình ảnh chai 2 mặt thạch để cấy dịch não tuỷ | 51 |
| 19 | Hình ảnh các loại vật liệu vô trùng nên được dùng để lấy dịch não tuỷ hay các dịch không tạp nhiễm khác | 51 |
| 20 | Hình vẽ minh họa cách quệt họng để lấy mẫu | 57 |

| | | |
|---|---|---|
| 21 | Hình ảnh gram vi khuẩn bạch hầu | 57 |
| 22 | Hình vẽ minh hoạ nguyên tắc của thử nghiệm miễn dịch sắc ký phát hiện vi khuẩn Streptococci tan huyết beta nhóm A từ quệt họng | 56 |
| 23 | Hình ảnh tăm bông mảnh vô trùng nên dùng để lấy các quệt tai -mũi-họng | 65 |
| 24 | Hình ảnh các tube nắp vặn chặt chứa 5ml BHI có bổ sung XV | 65 |
| 25 | Hình ảnh các dụng cụ nên dùng và không nên dùng để lấy mẫu đờm | 74 |
| 26 | Hình ảnh các dụng cụ có thể dùng để lấy đàm qua đường mũi | 74 |
| 27 | Hình ảnh nhuộm gram mà dựa vào đó có thể đánh giá độ tin cậy mẫu đờm | 75 |
| 28 | Hình ảnh khóm vi khuẩn mọc trên các mặt thạch cấy định lượng mẫu đờm | 83 |
| 29 | Hình ảnh gram phết mủ niệu đạo có *N. gonorrhoeae* | 90 |
| 30 | Hình ảnh gram phết cặn lắng nước tiểu có *N. gonorrhoeae* | 90 |
| 31 | Các hình ảnh khảo sát trực tiếp quệt âm đạo hay cổ tử cung có *G. vaginalis* | 90 |
| 32 | Hình vẽ minh họa phương pháp tạo khí trường kỵ khí bằng phương pháp thay khí | 96 |
| 33 | Hình ảnh thiết bị Axonomat Mark II để cấy kỵ khí | 97 |
| 34 | Các hình ảnh khảo sát trực tiếp bằng phương pháp soi tươi | 104 |
| 35 | Hình vẽ minh họa các bước thực hiện phương pháp nhuộm gram | 107 |
| 36 | Hình ảnh bộ thuốc nhuộm gram | 108 |
| 37 | Hình ảnh kết quả quan sát một phết nhuộm gram | 108 |
| 38 | Hình ảnh bộ thuốc nhuộm Methylen Blue kiềm | 100 |
| 39 | Hình ảnh bộ thuốc nhuộm kháng acid | 113 |
| 40 | Hình ảnh kết quả quan sát phết nhuộm kháng acid | 114 |
| 41 | Hình ảnh bộ thuốc thử làm thuần nhất và loại trừ tạp nhiễm mẫu đờm | 115 |
| 42 | Hình ảnh kết quả các phết nhuộm kháng thể huỳnh quang | 128 |
| 43 | Hình vẽ minh họa cấu tạo một buồng cấy vi sinh | 138 |
| 44 | Hình vẽ minh hoạ cách bố trí các thiết bị và dụng cụ cần thiết cho một phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện | 142 |


# PHỤ LỤC C:

## Bảng tóm tắt các vật liệu lấy mẫu và môi trường phân lập tương ứng cho các bệnh phẩm khác nhau

| Bệnh phẩm | Vật liệu lấy mẫu | Môi trường phân lập |
|---|---|---|
| Máu | Chai cấy máu (hình 1.1, trang 14, hình 1.2, trang 16) | CA máu ngựa (tốt nhất) ± MC<br>BA máu cừu ± MC |
| Mủ | Tăm bông vô trùng lấy mẫu (hình 2.1, trang 22) ± Môi trường chuyên chở Stuart Amies (hình 2.2, trang 22) hay | Có thể cấy vào ống Thioglycollat hay BHI giàu XV (hình 7.2 trang 64) để lưu mẫu, phòng trường hợp trên các mặt thạch phân lập không có vi khuẩn mọc |
| | Tăm bông mảnh vô trùng lấy mẫu (hình 7.1, trang 65) ± môi trường chuyên chở Stuart Amies (hình 2.2, trang 16) hay | BA máu cừu + MC ± MSA ± Sabouraud Agar, hay |
| | Lọ lấy mẫu vô trùng nắp đỏ -vặn chặt (hình 3.1, trang 29) hay tube Eppendorf biopure, hay tube 1,8ml vô trùng, hay tube 5ml vô trùng F2M (hình 5.5, trang 51) hay Pipet Pasteur nhựa vô trùng, hay ống chích nhựa vô trùng. Đây là các loại phương tiện để lấy các mẫu mủ áp xe. | BANg + MC ± MSA ± Sabouraud Agar, hay<br>Chai 2 mặt thạch CAXV cấy dịch không tạp nhiễm (hình 5.2, trang 48) như cấy mủ áp xe trong phiên trực không có vi sinh. |

| | | |
|---|---|---|
| Phân | Lọ lấy mẫu phân không có F2M (hình 3.2 trang 29) dùng lấy mẫu phân tươi -cấy ngay, hay<br>Tăm bông vô trùng lấy mẫu (hình 2.1, trang 22) dùng lấy phân tươi hay quệt hậu môn - cấy ngay, hay<br>NẾU KHÔNG CẤY NGAY THÌ DÙNG TĂM BÔNG VÔ TRÙNG LẤY MẪU + Môi trường chuyên chở Cary -Blair (hình 3.3, trang 29) | Nên cấy phong phú vào GN broth ± Pepton kiềm cho *Vibrio* ± Campy-thio cho *C. jejuni*<br>MC (hay EMB) + SS (hay XLD, hay HE) ± TCBS/MEA cho *Vibrio* ± Campy-BAP cho *C. jejuni* |
| Nước tiểu | Lọ lấy mẫu vô trùng nắp đỏ -vặn chặt (hình 3.1, trang 29) | BA ± MC hay EMB, hay<br>BANg + MC hay EMB, hay<br>Chai 2 mặt thạch BANg và MC (hình 4.4, trang 40) cấy nước tiểu trong phiên trực |
| Dịch não tuỷ | Tube 1,8ml vô trùng nắp vàng (hình 5.5 trang 51)<br>Tube Falcon 15ml vô trùng nắp xanh (hình 5.5 trang 51)<br>Tube 5ml vô trùng nắp đỏ (hình 5.5 trang 51)<br>Tube Eppendorf biopure (hình 5.5 trang 51) | CAXV ± MC, hay<br>Chai 2 mặt thạch CAXV cấy dịch không tạp nhiễm (dùng cấy DNT trong phiên trực) |
| Quệt hầu họng | Tăm bông vô trùng lấy mẫu (hình 2.1, trang 22) ± Môi trường chuyên chở Stuart Amies (hình 2.2 trang 29) | BA, hay BAGe, hay<br>BA-tellurite ± Loeffler (nếu muốn phân lập bạch hầu), hay<br>CAHI (nếu muốn phân lập *H. influenzae*), hay CATM (nếu muốn phân lập *N. gonorrhoeae*) |
| Tai, mắt, mũi, xoang | Tăm bông vô trùng lấy mẫu (hình 2.1, trang 22) ± Môi trường chuyên chở Stuart Amies (hình 2.2, trang 22) hay<br>Tăm bông mảnh vô trùng lấy mẫu (hình 7.1 trang 64) ± Môi trường chuyên chở Stuart Amies (hình 2.2, trang 22) hay<br>Lọ lấy mẫu vô trùng nắp đỏ -vặn chặt (hình 3.1 trang 29) hay tube Eppendorf biopure hay tube 1,8ml vô trùng, hay tube 5ml vô trùng (hình 5.5 trang 51) | Trong trường hợp quệt mủ mắt, nên tăng sinh vào BHI giàu XV (hình 7.2 trang 64) trước khi cấy vào môi trường phân lập.<br>BA hay BANg hay BAGe + MC + CAXV |
| Đờm và các bệnh phẩm có đờm | Lọ lấy mẫu vô trùng nắp đỏ -vặn chặt (hình 3.1 trang 29) hay<br>Bộ lấy đờm qua ống thông mũi (hình 8.2 trang 74) | BA hay BANg hay BAGe + MC + CAXV |
| Sinh dục | Tăm bông vô trùng lấy mẫu (hình 2.1 trang 22) ± môi trường chuyên chở Stuart Amies (hình 2.2 trang 22) hay<br>Tăm bông mảnh vô trùng lấy mẫu (hình 7.1 trang 64) ± môi trường chuyên chở Stuart Amies (hình 2.2 trang 22) hay<br>Lọ có F2M để lấy mẫu (hình 3.2 trang 29) để soi tươi tìm*T. vaginalis* | CATM ± BA hay BANg ± MC (nếu có yêu cầu cấy vi khuẩn khác ngoài vi khuẩn lậu). |
| Cấy yếm khí | Tăm bông vô trùng lấy mẫu (hình 2.1 trang 22) ± môi trường chuyên chở yếm khí Carryport, hay<br>Chai cấy máu yếm khí<br>Ống chích nhựa, loại ống chích insulin vô trùng để hút lấy mủ | BAYK để cấy yếm khí + các môi trường cấy hiếu khí mẫu mủ (BA + MC). |

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

# KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM VI SINH LÂM SÀNG

*Chịu trách nhiệm xuất bản*
HOÀNG TRỌNG QUANG

| | |
|---|---|
| *Biên tập:* | NGUYỄN TIẾN DŨNG |
| *Sửa bản in:* | NGUYỄN TIẾN DŨNG |
| *Trình bày bìa:* | CHU HÙNG |
| *Kt vi tính:* | BÙI HUỆ CHI |

In 1000 cuốn, khổ 19 x 27cm tại Xưởng in Nhà xuất bản Y học.
Số đăng ký kế hoạch xuất bản: 23 - 2006/CXB/36 - 271/YH
In xong và nộp lưu chiểu quý II năm 2006.

*Tìm đọc*

- *Vi sinh y học*
- *Hoá sinh lâm sàng*
- *Vi sinh vật y học*
- *Ký sinh trùng y học*
- *Hoá sinh học*
- *Ký sinh vật y học*

¥017 165

**NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC**

Địa chỉ: 352 Đội Cấn - Ba Đình - Hà Nội

Tel: 04.7625922 - 7625934 - 7.627819 - Fax: 04.7625923

E-mail: Xuatbanyhoc@fpt.vn

Website: www.cimsi.org.vn/nhaxuatbanyhoc

**GIÁ: 29.000Đ**