

### KTV Võ Thị Thu Nguyệt - Khoa Vi sinh

Đồ có thu thập, theo dõi, đánh giá và so sánh đồ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh giữa các vùng trong một quốc gia và giữa các nước trên thế giới, yêu cầu cần phải đưa ra là các kết quả phải xuất phát từ một kết thu thập chính xác và thống nhất.

Theo báo cáo của các phòng thí nghiệm quốc tế nghiên cứu về phương pháp thí nghiệm đồ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh và của NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Tổ chức y tế thế giới đã rút ra nhu cầu tiêu chuẩn và đưa ra những chỉ dẫn chung cho các kết thu thập kháng sinh đồ: đó là kết thu thập kháng sinh khuếch tán trên đĩa kháng sinh vào môi trường thạch của Kirby – Bauer. Mỗi phòng thí nghiệm, mỗi nước có thể tùy tình hình cụ thể mà cải tiến chút ít để phù hợp với hoàn cảnh sao cho kinh tế và thuận lợi đưa trên phương pháp này.

Ở Việt Nam từ những năm 1989 được sự tài trợ của tổ chức SIDA – Thụy Điển, chương trình ASTS đã thống nhất về kết thu thập kháng sinh đồ trong toàn quốc. Vì thế để thống nhất kết thu thập với thế giới và có thể so sánh số liệu thu được với các nước khác, chúng tôi giới thiệu kết thu thập xác định mức độ kháng thuốc của vi khuẩn theo phương pháp Kirby- Bauer cải tiến: Phương pháp khoan giếng kháng sinh khuếch tán trong thạch.

### I. Mục đích và các kết thu thập kháng sinh đồ

Kháng sinh đồ là kết thu thập đo khả năng của một loài kháng sinh ức chế sự phát triển của vi khuẩn in vitro. Khả năng này có thể được đánh giá bằng phương pháp pha loãng kháng sinh hoặc phương pháp khuếch tán kháng sinh vào môi trường thạch.

#### 1.1. Mục đích

- Nhằm hướng dẫn cho các bác sĩ lâm sàng chọn lựa kháng sinh tối nhất cho từng bệnh nhân

## Kháng sinh đồ

Viết bởi Biên tập viên

Thứ sáu, 30 Tháng 1 2015 20:52 - Lần cập nhật cuối Thứ sáu, 30 Tháng 1 2015 21:03

---

- Nhóm thu thập thông tin dịch tễ học về sự kháng của vi khuẩn gây bệnh quan trọng cộng đồng

### 1.2. Các kỹ thuật kháng sinh đồ

Kỹ thuật kháng sinh pha loãng trong thạch hoặc canh thang nhằm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của kháng sinh đối với vi khuẩn (định lượng)

Kỹ thuật kháng sinh khuếch tán trong thạch thường được áp dụng để xác định độ nhạy cảm của vi khuẩn với những kháng sinh khác nhau (định tính). Đây kháng sinh khuếch tán được thực hiện trong những khoảng giếng với hàm lượng nhất định.

## II. Kỹ thuật kháng sinh khuếch tán trong thạch

Đây là phương pháp đơn giản và có thể tiến hành ở các phòng thí nghiệm hàng ngày không cần thiết bị và máy móc.

**2.1. Nguyên lý:** Dùng khoảng giếng có đường kính và độ dày nhất định, vô trùng đã tẩm sẵn kháng sinh với nồng độ nhất định (đưa vào hiệu quả của nồng độ kháng sinh), đặt lên mặt đĩa môi trường đã nuôi cấy vi khuẩn. Nồng độ vi khuẩn cũng đã được quy định trước. Để tìm cho vi khuẩn mức và đo đường kính vòng ức chế vi khuẩn xung quanh khoảng giếng kháng sinh, đưa vào đó xác định mức độ nhạy cảm của vi khuẩn đối với kháng sinh đó.

### 2.2. Các yếu tố ảnh hưởng tới kết quả kháng sinh đồ

#### 2.2.1. Môi trường

## Kháng sinh đ

Viết bởi Biên tập viên

Thứ sáu, 30 Tháng 1 2015 20:52 - Lần cập nhật cuối Thứ sáu, 30 Tháng 1 2015 21:03

---

- Thành phần môi trường:

Môi trường nghèo chất dinh dưỡng sẽ tạo ra vòng ức chế lớn hơn và ngược lại.

- Các chất hòa tan của môi trường như pepton, casein... làm cho môi trường dễ dàng chất dinh dưỡng nhưng chúng khó tính được như thịt, ngay cả một hằng xuất và những lô sản xuất khác nhau.

- Đối với một số vi khuẩn khó mọc môi trường cần cho thêm máu hoặc đông như máu thỏ, cừu, ngựa... các loại máu khác nhau không ảnh hưởng rõ rệt tới kết quả kháng sinh đồ, trừ máu chứa đông huyết Natri citrat để tetracylin.

- Chọn lọc thích hợp: thích hợp thì có nhiều pha chế làm cho vòng ức chế nhỏ lại. Thích hợp đã tinh chế không có những yếu tố gây bám kháng sinh sẽ cho kết quả tốt hơn.

- Các ion trong môi trường như  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  có ảnh hưởng lớn tới tác dụng của tetracyclin và aminoglycosid. Những ion này có hàm lượng khác nhau trong những lô môi trường khác nhau và mức độ hằng sản xuất khác nhau.

- Độ pH: có ảnh hưởng tới sự phát triển của vi khuẩn và tác dụng của kháng sinh, ví dụ: streptomycin, kanamycin, erythromycin, oleandomycin pH = 6 và 6,5 giảm tác dụng so với pH = 7,3 để pH thích hợp thu được vào nhiệt độ nên khi điểu chỉnh phải lưu ý điểm này.

- Độ dày của thạch: thích hợp phải có độ dày nhất định vì quá mỏng vùng ức chế sẽ rộng ra và ngược lại. Tốt nhất là dày 4mm.

- Làm khô một thích hợp: làm khô trước khi cấy để vi khuẩn dễ dàng trải đều, nếu một thích hợp thì chúng sẽ mọc thành thảm dày đặc thu hẹp vùng ức chế. Sau khi cấy vi khuẩn nếu để khô quá lâu thì vết khoanh cấy cũng sẽ làm vùng ức chế nhỏ lại.

### 2.2.2. Vi khuẩn

- Lượng vi khuẩn cấy vào môi trường có ảnh hưởng lớn tới độ nhạy kính vùng ức chế: quá nhiều, độ ức chế thu nhận ít và quá ít, mức độ vùng ức chế mở rộng ra. Tốt nhất là cấy sao cho các khuẩn lạc sát nhau mà không thành thảm.

- Dung dịch vi khuẩn (Inoculum) : là một dung dịch có độ đục nhất định thường là 108 vi khuẩn/ml (108 UFC/ml: Colony Forming Unit – đơn vị hình thành khuẩn lạc), kiểm định bằng ống đếm khuẩn Mc Farland 0,5. Độ đục này được pha chế bằng cách lấy 0,5 ml 0,048 M BaCl<sub>2</sub> (1,175 % BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O v/v) cộng với 99,5 ml 0,9 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v/v) , đóng vào các ống nghiệm có đũa nhúng nhau, hàn kín và giữ ở nhiệt độ phòng, có thể dùng trong vòng sáu tháng. Trộn khi sử dụng phải lắc.

### 2.2.3. Khoanh giấy thấm kháng sinh

Mỗi khoanh giấy thấm một loại kháng sinh nhất định của một loại kháng sinh. Thông thường các kháng sinh cùng họ được thấm lẫn nhau. Mỗi kháng sinh có độ bền vững khác nhau. Nhiệt độ và độ ẩm cao làm bột hoạt kháng sinh nhanh, nhất là họ kháng sinh  $\beta$ -Lactam. Vì vậy việc cất giữ tốt nhất là ở nhiệt độ -200C hoặc 40C trong các lọ kín nút, chng m. Có thể mua khoanh giấy thấm kháng sinh của nước ngoài hay tự sản xuất. Nếu tự sản xuất có thể dùng nhiều loại giấy thấm khác nhau. Giấy nhuộm màu có thể ảnh hưởng tới kháng sinh tetracyclin. Khoanh giấy thấm sản xuất cần có kiểm tra độ đồng đều và tác động để chng với khoanh giấy chuẩn thẩm kháng sinh thường của nước ngoài.

## 2.3. Các bước tiến hành

**2.3.1. Chuẩn bị môi trường:** môi trường được chuẩn bị theo hướng dẫn của hãng sản xuất bằng cách cân chính xác lượng thuốc Mueller – Hinton khô và hòa tan vào nước cất trung tính, kiểm tra pH trước khi hấp tiệt khuẩn. Trong khi hấp, tránh để môi trường ở nhiệt độ cao và thời gian dài hơn số cần thiết, vì điều đó sẽ làm giảm khả năng đệm và thay đổi pH của môi trường. Sau khi đã nguội môi trường đến 50 – 600C (có pH khoảng 7,2 – 7,4) có thể thêm máu hoặc các sản phẩm của máu...lúc cho đều và đổ vào đĩa petri đã vô khuẩn với độ dày từ 3,5 – 4,5

## Kháng sinh đồ

Viết bởi Biên tập viên

Thứ sáu, 30 Tháng 1 2015 20:52 - Lần cập nhật cuối Thứ sáu, 30 Tháng 1 2015 21:03

---

mm (có nghĩa là là 25 ml thích cho mặt đĩa petri đường kính 90 mm hoặc 40ml thích cho đĩa có đường kính là 110mm). Các đĩa này phải đặt trên mặt mặt phẳng ngang bằng để đảm bảo cho độ sâu của thích cho mặt và vị trí trong đĩa bằng nhau. Đặt đĩa môi trường nuôi cấy nhiệt độ phòng rồi bỏ vào quai trong túi nylon và ủ ở nhiệt độ 4-80C. Các đĩa thích này dùng trong vòng 7 ngày kể từ ngày chuẩn bị.

Các đĩa thích có máu (hoặc các sản phẩm của máu) phải được kiểm tra vô khuẩn trong tủ ấm qua đêm mới được sử dụng.

**2.3.2. Ria cấy vi khuẩn:** Sau khi vi khuẩn thu được khi cấy nuôi cấy qua đêm trên các môi trường không có chất ức chế, dùng que cấy lấy 5-10 khuẩn lạc, nghiền trong mặt ống nghiệm mới mua sinh lý vô trùng lọc bỏ máy vortex, so sánh với ống để đếm khuẩn Mc Farland 0,5 (nếu quá cho thêm nước muối sinh lý; ngược lại không để để cho thêm vi khuẩn), ta đếm được hàm lượng vi khuẩn trong ống để đếm 108 CFU/ml. Dùng que tắm bông vô trùng nhúng vào hàm lượng vi khuẩn trên ép vào thành ống cho bột nước, rồi ria đều khắp mặt thích thành những đường chéo nhau 1200 lần mặt thích đã đếm được trong tủ ấm cho khô (nếu không đếm được quá 30 phút).

**2.3.3. Chuẩn bị khoan giấy kháng sinh:** Lấy ống khoan giấy kháng sinh và ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút cho thẳng bằng nhiệt độ trong và ngoài ống.

Đặt các khoan giấy đã chọn vào vỉ và để vi khuẩn đã đếm được thích sao cho mặt của khoan giấy áp sát vào mặt môi trường, mép ngoài của khoan giấy cách thành trong của đĩa khoảng 15mm và khoan cách khoan kia 20mm. Đặt thích ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút cho kháng sinh khuếch tán, rồi để môi trường trong tủ ấm 350C qua đêm. Các đĩa thích nghiệm với các chủng H. influenzae, S. pneumoniae... phải để trong tủ ấm có 5-10% CO<sub>2</sub>.

**2.3.4. Đếm kết quả:** Dùng thước chia mm đo đường kính vùng ức chế, đưa vào tiêu chuẩn của ống hăng sản xuất khoan giấy kháng sinh, so sánh đường kính vòng ức chế đo được với giá trị hàm lượng kính vòng ức chế cho ống lọc kháng sinh, ta có mức độ nhạy cảm, trung gian và đề kháng của ống lọc vi khuẩn.

Nhạy cảm (Sensitivity) nghĩa là vi khuẩn gây nhiễm khuẩn có thể di truyền được với liều thông thường đã được khuyến cáo.

Trung gian (Intermediate) bao gồm các chủng có đường kính vòng vô khuẩn trong giếng hân (có nghĩa là MIC của chúng thấp hơn gấp đôi đường kính khuếch tán trong máu và tiểu cầu). Một số trung gian có thể áp dụng đường kính trên lâm sàng khi thuốc có đặc tính tập trung đặc biệt và vị trí nhiễm khuẩn (ví dụ: các  $\beta$ -Lactam và quinolon trong nước tiểu) hoặc khi thuốc có liều cao (thí dụ có thể tăng liều các  $\beta$ -Lactam để vượt qua vón đề kháng thuốc, vì liều khuyến cáo còn xa giếng hân gây tác động phụ)

Đề kháng (Resistan): các chủng vi khuẩn không biểu hiện bất kỳ nồng độ nào của thuốc mà cũng có thể chấp nhận được.

## 2.4. Kiểm tra chất lượng

### 2.4.1. Tiến hành:

Đầu tiên báo chính xác kết quả xét nghiệm hàng ngày về độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh, phải kiểm tra thông tin xuyên biên giới của chủng mẫu có độ nhạy cảm không thay đổi với các chất kháng khuẩn, công việc này phải tiến hành song song cùng với các chủng mẫu phân lập của xét nghiệm. Trước khi sử dụng lô môi trường mẫu hoặc khoanh giẫy kháng sinh mẫu cũng phải tiến hành kiểm tra chất lượng bằng các chủng mẫu. Các chủng mẫu dùng để kiểm tra chất lượng là:

- Escherichia coli ATCC 25922
- Staphylococcus aureus ATCC 29213
- Streptococcus faecalis ATCC 29212
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

### 2.4.2. Đánh giá kết quả

Vùng ức chế phải nằm trong các giếng hân đã cho trước.

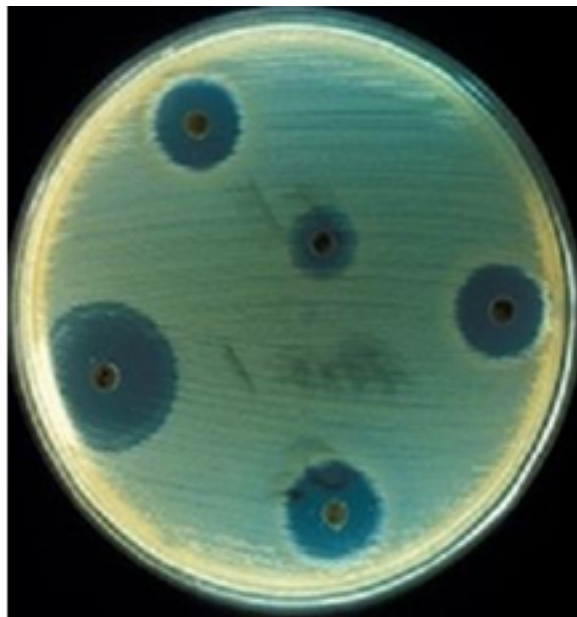
## Kháng sinh đồ

Vị trí bài Biên tập viên

Thứ sáu, 30 Tháng 1 2015 20:52 - Lần cập nhật cuối Thứ sáu, 30 Tháng 1 2015 21:03

---

- Một số hình ảnh minh họa kháng sinh đồ trên thạch Mueller-Hinton.



-Hình ảnh minh họa kháng sinh đồ trên thạch máu.



## Kháng sinh đ

Viết bởi Biên tập viên

Thứ sáu, 30 Tháng 1 2015 20:52 - Lần cập nhật cuối Thứ sáu, 30 Tháng 1 2015 21:03

---

*Người n: Tài liệu tập huấn nghiên cứu chẩn đoán phòng thí nghiệm các bệnh nguyên vi sinh vật gây nhiễm trùng đường hô hấp cấp cộng đồng ở Việt Nam (thuộc dự án trung tâm CARLO URBANI)*