

**YH2.29** Ế

# **KỸ THUẬT CƠ BẢN VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG TRONG XÉT NGHIỆM VI SINH Y HỌC**

**SÁCH ĐÀO TẠO CỬ NHÂN KỸ THUẬT Y HỌC CHUYÊN NGÀNH XÉT NGHIỆM**

Chủ biên: PGS.TS. Đinh Hữu Dung

12

4



**THƯ VIỆN  
HUBT**



**NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC**

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

BỘ Y TẾ

# KỸ THUẬT CƠ BẢN VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG TRONG XÉT NGHIỆM VI SINH Y HỌC

SÁCH ĐÀO TẠO CỬ NHÂN KỸ THUẬT Y HỌC  
CHUYÊN NGÀNH XÉT NGHIỆM

Mã số: ĐK.01.Z.01

Chủ biên: PGS.TS. Đinh Hữu Dung



## LỜI GIỚI THIỆU

Thực hiện một số điều của Luật Giáo dục, Bộ Giáo dục & Đào tạo và Bộ Y tế đã ban hành chương trình khung đào tạo Cử nhân kỹ thuật y học. Bộ Y tế tổ chức biên soạn tài liệu dạy – học các môn học chuyên môn, cơ bản chuyên ngành theo chương trình trên nhằm từng bước xây dựng bộ tài liệu dạy – học chuẩn về chuyên môn để đảm bảo chất lượng đào tạo nhân lực y tế.

Sách “*Kỹ thuật cơ bản và đảm bảo chất lượng trong xét nghiệm vi sinh y học*” được biên soạn dựa vào chương trình giáo dục đại học của Trường Đại học Y Hà Nội trên cơ sở chương trình khung đã được phê duyệt. Sách được biên soạn theo phương châm: kiến thức cơ bản, hệ thống; nội dung chính xác, khoa học, cập nhật các tiến bộ khoa học, kỹ thuật hiện đại và thực tiễn Việt Nam.

Sách “*Kỹ thuật cơ bản và đảm bảo chất lượng trong xét nghiệm vi sinh y học*” đã được biên soạn bởi các nhà giáo giàu kinh nghiệm và tâm huyết của Bộ môn Vi sinh vật, Trường Đại học Y Hà Nội. Sách “*Kỹ thuật cơ bản và đảm bảo chất lượng trong xét nghiệm vi sinh y học*” đã được Hội đồng chuyên môn của Bộ Y tế thẩm định năm 2008. Bộ Y tế ban hành tài liệu đạt chuẩn chuyên môn này để sử dụng cho ngành trong giai đoạn hiện nay. Trong quá trình sử dụng, sách phải được chỉnh lý, bổ sung và cập nhật.

Bộ Y tế xin chân thành cảm ơn các chuyên gia của Trường Đại học Y Hà Nội đã dành nhiều công sức biên soạn cuốn sách. Cảm ơn TS. Phạm Hùng Vân và PGS.TS.Vũ Đình Chính đã đọc phản biện để cuốn sách sớm hoàn thành kịp thời phục vụ cho công tác đào tạo nhân lực y tế.

Vi lần đầu xuất bản, chúng tôi mong nhận được ý kiến đóng góp của đồng nghiệp, các bạn sinh viên và các độc giả để lần xuất bản sau sách được hoàn thiện hơn.

**VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO  
BỘ Y TẾ**



## LỜI NÓI ĐẦU

Năm học 2000 –2001 Trường Đại học Y Hà Nội bắt đầu đào tạo Cử nhân Kỹ thuật Y học, chuyên ngành Xét nghiệm Y học. Trong chương trình đào tạo đối tượng này, kỹ thuật xét nghiệm cơ bản và đảm bảo chất lượng trong xét nghiệm được cấu trúc thành hai học phần riêng biệt, trong đó bộ môn Vi sinh vật tham gia giảng dạy một số học trình. Những năm qua tài liệu dạy-học Vi sinh của hai học phần này chỉ là những tài liệu phát tay. Cuốn giáo trình “*Kỹ thuật cơ bản và đảm bảo chất lượng trong xét nghiệm vi sinh y học*” được biên soạn nhằm khắc phục tình trạng đó.

Nội dung cuốn sách bao gồm những kỹ thuật cơ bản và những nội dung thiết yếu nhất về đảm bảo chất lượng mà một người làm việc trong phòng xét nghiệm Vi sinh y học phải thực hiện được, vì vậy cuốn sách cũng là tài liệu tham khảo tốt cho các học viên sau đại học chuyên ngành Vi sinh và các đồng nghiệp trẻ làm việc tại các phòng xét nghiệm Vi sinh. Mục tiêu học tập của mỗi bài thường bao gồm 2 nội dung: lý thuyết thực hành và kỹ năng thực hành. Với tài liệu này một sinh viên tự học tích cực có thể đạt được mục tiêu “lý thuyết thực hành”, nhưng “kỹ năng thực hành” chỉ có thể đạt được sau thực tập tại phòng xét nghiệm.

Đây là tài liệu dạy học được chính thức biên soạn lần đầu tiên nên chắc chắn còn có thiếu sót, chúng tôi mong các sinh viên, học viên và các bạn đồng nghiệp phát hiện để giáo trình có thể được sửa chữa, bổ sung trong lần in sau.

Thay mặt các tác giả

*Chủ biên*

**PGS.TS. ĐINH HỮU DUNG**



# MỤC LỤC

Lời nói đầu	
Bài 1. Quy định về làm việc trong phòng xét nghiệm vi sinh	9
	<i>Nguyễn Thị Vinh</i>
Bài 2. Sử dụng và bảo quản kính hiển vi	13
	<i>Bùi Khắc Hậu</i>
Bài 3. Xử lý dụng cụ thủy tinh nhiễm vi sinh vật	19
	<i>Nguyễn Thị Vinh</i>
Bài 4. Các biện pháp diệt trùng và khử trùng	23
	<i>Lê Hồng Hình</i>
Bài 5. Kỹ thuật pha một số dung dịch nhuộm và dung dịch thử - phát hiện tính chất sinh vật hoá học thường dùng trong xét nghiệm vi sinh	31
	<i>Nguyễn Thị Tuyền</i>
Bài 6. Điều chế môi trường nuôi cấy vi khuẩn	40
	<i>Nguyễn Thị Tuyền</i>
Bài 7. Thao tác vô trùng	47
	<i>Đình Hữu Dung</i>
Bài 8. Cấy vi khuẩn vào các loại môi trường	53
	<i>Đình Hữu Dung</i>
Bài 9. Pha huyền dịch và cấy đếm vi khuẩn	57
	<i>Nguyễn Thị Vinh</i>
Bài 10. Lấy, xử lý và bảo quản huyết thanh	60
	<i>Lê Văn Phụng</i>
Bài 11. Lấy máu thử	62
	<i>Lê Văn Phụng</i>
Bài 12. Tiêm truyền súc vật thí nghiệm	65
	<i>Lê Văn Phụng</i>
Bài 13. Những khái niệm cơ bản về đảm bảo chất lượng xét nghiệm vi sinh	68
	<i>Đình Hữu Dung</i>
Bài 14. Đảm bảo chất lượng trong xét nghiệm vi sinh: giám sát chất lượng - nội kiểm (Internal Quality Control)	77
Tài liệu tham khảo	90



# QUI ĐỊNH VỀ LÀM VIỆC TRONG PHÒNG XÉT NGHIỆM VI SINH

## MỤC TIÊU

1. Trình bày và thực hiện đúng những qui định làm việc trong labo vi sinh.
2. Trình bày và thực hiện đúng những biện pháp khử trùng chỗ làm việc và xử lý chất thải.
3. Trình bày được các biện pháp phòng ngừa và xử trí được một số tai nạn có thể xảy ra trong labo vi sinh.

## MỞ ĐẦU

Phòng xét nghiệm (labo) Vi sinh của mỗi cơ sở y tế cần phải thực hiện những công việc chẩn đoán trực tiếp và chẩn đoán gián tiếp giúp bác sĩ lâm sàng điều trị các bệnh nhiễm trùng và phục vụ công tác dự phòng. Tuy theo khả năng và qui mô của cơ sở (bệnh viện) mà labo phải có những trang thiết bị cần thiết. Tuy vậy, con người vẫn luôn đóng vai trò chủ chốt nên labo cần phải có một đội ngũ cán bộ được đào tạo làm xét nghiệm vi sinh.

Làm việc trong labo Vi sinh là làm việc với vi sinh vật gây bệnh nên luôn có nguy cơ bị nhiễm trùng không những cho bản thân người làm xét nghiệm mà còn cho con người và môi trường xung quanh. Vì vậy, mỗi nhân viên labo không những phải tuân thủ đầy đủ những qui định về làm việc với vi sinh vật gây bệnh, mà còn phải hiểu biết được những nguy cơ để thực hiện nghiêm những biện pháp phòng ngừa tai nạn nghề nghiệp.

## 1. NHỮNG QUI ĐỊNH ĐỂ PHÒNG NHIỄM TRÙNG

Nhân viên làm việc với vi sinh vật gây bệnh phải được học cách làm việc thận trọng với các vi sinh vật gây bệnh, đặc biệt là các thao tác vô trùng.

Để đề phòng nhiễm trùng, khi làm việc trong labo vi sinh mỗi nhân viên phải thực hiện nghiêm túc những qui định sau đây:

1. Không ăn, uống, hút thuốc trong labo.

2. Phải mặc áo choàng (không được mặc áo choàng ra ngoài khu vực làm việc); khi tiếp xúc với bệnh phẩm và vi sinh vật gây bệnh phải mang găng tay.

3. Thận trọng khi sử dụng pipet/ống hút (không hút bằng miệng huyền dịch có vi sinh vật gây bệnh).

4. Thận trọng không để bắn các giọt nhỏ ra không khí; khi lắc các dung dịch có vi sinh vật gây bệnh hoặc khi ly tâm phải đậy nắp kín, không được mở nắp khi máy chưa dừng hẳn.

5. Thực hiện công việc xét nghiệm xong phải rửa tay kỹ bằng xà phòng hoặc khử trùng bàn tay.

6. Khử trùng thường xuyên bàn, phòng làm việc. Trên bàn chỉ để những dụng cụ hàng ngày sử dụng, không để dụng cụ dự trữ (dung cụ, hoá chất lưu trữ phải để trong tủ hoặc kho riêng).

Các nhân viên của labo cần phải được kiểm tra sức khoẻ định kỳ. Với một số vi sinh vật có vaccin phòng bệnh họ cần được tiêm chủng và kiểm tra hiệu quả đáp ứng miễn dịch, ví dụ vaccin phòng bệnh do virus viêm gan B.

## 2. KHỬ TRÙNG CHỖ LÀM VIỆC VÀ XỬ LÝ CHẤT THẢI

Nhân viên labo phải có thói quen khử trùng bàn tay mỗi khi thực hiện xong một công việc hoặc tiếp xúc với đồ vật chứa vi sinh vật gây bệnh.

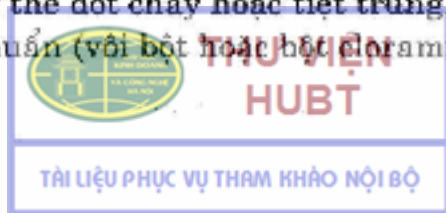
Phòng làm việc phải luôn được giữ sạch sẽ, chống lây nhiễm bằng cách:

1. Lau chùi bàn làm việc, sàn nhà bằng chất sát khuẩn.

2. Dụng cụ nhiễm vi sinh vật và chất thải có tác nhân gây bệnh phải được tập trung trong những thùng chứa riêng biệt, có nắp đậy kín và phải được tiệt trùng hàng ngày (bằng lò hấp hoặc bằng dung dịch kiềm hay acid đặc). Kim tiêm dùng một lần, sau khi dùng xong phải được cho vào lọ/hộp chứa chuyên biệt và tiệt trùng hàng ngày; những hộp chứa này phải có thành dày không bị kim đâm thủng, miệng rộng & có nắp đậy; thận trọng tránh kim đâm vào tay. Sau khi được tiệt trùng, các dụng cụ đã sử dụng và chất thải sẽ không còn khả năng gây ô nhiễm cho môi trường.

3. Thiết bị (ví dụ tủ ấm, máy ly tâm, ...) nhiễm vi sinh vật gây bệnh (ví dụ do đổ/vỡ ống nghiệm) phải được khử trùng ngay bằng chất sát khuẩn.

4. Nếu có sử dụng súc vật thí nghiệm, phải tuyệt đối đảm bảo vệ sinh môi trường và khử trùng chất thải trước khi cho vào hệ thống nước thải chung. Khi súc vật chết, nếu không thể đốt cháy hoặc tiệt trùng, xác phải được chôn trong hố sâu cùng chất sát khuẩn (vôi bột hoặc bột than amin) và cách xa nguồn nước (sông, ao, hồ).



### 3. ĐỂ PHÒNG VÀ XỬ TRÍ MỘT SỐ TAI NẠN HAY GẶP

Tuy làm việc thận trọng, song một số tai nạn vẫn có thể xảy ra trong labo. Chúng ta phải biết trước để thực hiện nghiêm chỉnh những biện pháp phòng ngừa và nếu có xảy ra thì biết cách xử trí kịp thời.

#### 3.1. Tủ thuốc cấp cứu

Tủ thuốc cấp cứu bao gồm một số thuốc sau:

- Nước cất vô trùng (hoặc dung dịch hydragyrum oxycyanatum 0,1% đựng trong chai nâu) để rửa mắt.
- Vaseline 0,1% oxycyanat để nhỏ mắt, mũi hoặc bôi môi.
- Dung dịch iod, lugol để bôi da bị thương.
- Dung dịch 0,5%  $KMnO_4$  để xúc miệng, rửa vết thương.

#### 3.2. Một số tổn thương, tai nạn và biện pháp phòng ngừa, xử trí

Một số tổn thương và tai nạn thường gặp cùng các biện pháp phòng ngừa và xử trí được tổng hợp trong bảng 1.1 dưới đây.

**Bảng 1.1.** Một số tổn thương, tai nạn thường gặp và biện pháp phòng ngừa, xử trí

Loại tổn thương	Biện pháp phòng ngừa	Xử trí
<i>Tổn thương cơ học hoặc do hoá chất</i>		
<b>1. Mắt</b>		
Do dụng cụ thủy tinh vỡ, dung dịch hoá chất hoặc chất sát khuẩn có nồng độ cao bắn vào mắt.	Đeo kính	Nhanh chóng rửa kỹ bằng nước sạch và chuyển khám chuyên khoa.
<b>2. Mũi</b>		
Do chất sát khuẩn, dung dịch kiềm hoặc acid.	Đeo khẩu trang	Bôi vaselin oxycyanat.
<b>3. Da</b>		
- Do mảnh thủy tinh vỡ. - Do kim tiêm hoặc dụng cụ kim loại sắc nhọn khác. - Bỏng	Thận trọng Thận trọng Thận trọng	- Xử lý vết thương. - Bóp (hút) cho máu chảy; rửa nước sạch; bôi cồn (iod hoặc betadin). - Cho nước lạnh chảy qua (khoảng 10 phút) sau đó bôi mỡ chống bỏng.



THƯ VIỆN  
HUBT



**Bảng 1.1. (Tiếp)**

<b>Nhiễm vi sinh vật</b>		
1. Tổn thương ngoài da có nguy cơ bị nhiễm trùng.	Thận trọng	- Xử lý vết thương (+ thuốc sát khuẩn).
2. Vi khuẩn gây bệnh vào miệng.	Không hút pipet bằng miệng	- Không nuốt; xúc miệng kỹ (nếu có thể, bằng nước có chất sát khuẩn).
3. Viêm gan truyền nhiễm.	- Đi găng tay - Thận trọng không để kim tiêm đâm. - Tiêm phòng	- Khử trùng bàn tay ngay. - Báo cáo lãnh đạo labo để có biện pháp thích hợp nếu cần thiết.
4. HIV/AIDS	- Đi găng tay - Thận trọng không để kim tiêm đâm.	- Khử trùng bàn tay ngay. - Báo cáo lãnh đạo labo để có biện pháp thích hợp nếu cần thiết.
<b>Loại tai nạn</b>		<b>Biện pháp phòng ngừa</b>
<b>Cháy</b> Đèn cồn, bếp điện, bếp ga ...		Sẵn sàng bình cứu hoả, số điện thoại cấp cứu.
<b>Nổ lò hấp</b>		- Kiểm tra kỹ thuật định kỳ. - Thực hiện nghiêm chỉnh qui trình vận hành.

## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Vì sao mỗi người làm việc trong labo vi sinh phải tuân thủ đầy đủ các qui định đã đề ra?
2. Nêu 6 qui định để phòng nhiễm trùng.
3. Phải làm gì để giữ cho môi trường trong labo không bị nhiễm trùng?
4. Phải làm gì để labo vi sinh không gây ô nhiễm ra môi trường bên ngoài?
5. Liệt kê những tai nạn có thể xảy ra trong labo vi sinh và cho biết cách xử trí những tai nạn đó.



# SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN KÍNH HIỂN VI

## MỤC TIÊU

1. Kể được các đặc điểm của kính hiển vi có vật kính dầu.
2. Thực hiện được các thao tác để có ảnh sáng tối đa.
3. Thực hiện được các thao tác sử dụng vật kính dầu để soi vi khuẩn.
4. Kể được các thao tác sử dụng kính hiển vi nền đen.
5. Kể được các thao tác bảo quản kính hiển vi nói chung.

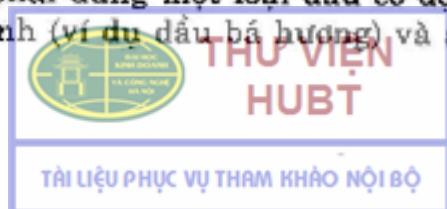
## 1. MỞ ĐẦU

Trong ngành vi sinh vật học nói chung và vi sinh y học nói riêng kính hiển vi quang học rất có giá trị trong việc nghiên cứu hình thái, cấu tạo tế bào vi sinh vật. Kích thước của vi sinh vật được tính bằng micrômet ( $1\mu\text{m} = 0,001\text{mm} = 10^{-3}\text{mm}$ ) và phần lớn chỉ có thể phát hiện được với sự giúp đỡ của các kính hiển vi có độ phóng đại đối tượng nghiên cứu lên hàng trăm lần (kính hiển vi quang học) và lên hàng vạn lần (kính hiển vi điện tử). Trong nghiên cứu vi sinh vật học người ta thường dùng kính hiển vi quang học nền trắng và nhiều khi với kính hiển vi có thiết bị phản pha (phase contrast). Ngoài ra người ta còn sử dụng rộng rãi cả kính hiển vi có bộ tụ quang nền đen và kính hiển vi huỳnh quang.

Bài này giới thiệu 2 loại kính hiển vi thường được áp dụng để nghiên cứu trong phòng xét nghiệm Vi sinh y học, đó là kính hiển vi quang học có vật kính dầu và kính hiển vi nền đen.

## 2. SỬ DỤNG KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC CÓ VẬT KÍNH DẦU

Vật kính dầu là loại vật kính có độ phóng đại 100X, có cửa ánh sáng đi qua rất nhỏ (nhỏ hơn rất nhiều so với vật kính 8X và vật kính 40X). Khi dùng vật kính dầu bắt buộc phải dùng một loại dầu có độ chiết quang bằng với độ chiết quang của thủy tinh (ví dụ dầu bá hương) và ánh sáng đi qua phải đạt tối đa.



## 2.1. Sử dụng vật kính dầu

Muốn sử dụng kính hiển vi có vật kính dầu cần tuân theo các bước sau đây:

- Nhận biết vật kính dầu: Vật kính có độ phóng đại 100X, có một vòng khuyên màu đen hoặc trắng trên thân và so với các vật kính khác thì vật kính dầu có cửa ánh sáng đi qua nhỏ nhất.
- Lấy ánh sáng tối đa :
  - + Đưa vật kính về đúng trục quang học.
    - Mở chắn sáng.
    - Bỏ lọc sáng.
    - Nâng tụ quang lên hết mức.
    - Dùng gương lõm hướng về nguồn sáng (nếu kính hiển vi đã có nguồn sáng bằng hệ thống đèn gắn vào kính thì thao tác này không cần thực hiện).
- Cho dầu:

Giỏ 1 giọt dầu bá hương (còn gọi là dầu "séc") lên nơi đã dàn đồ phiến.

- Tiến hành soi kính để tìm vi khuẩn :

- + Trước hết hạ thân kính (hoặc nâng mâm kính, tùy từng loại kính) để cho vật kính chạm giọt dầu.
- + Tiếp tục hạ vật kính một cách từ từ để vật kính chạm vào tiêu bản.

Trong khi thực hiện các thao tác này, người cán bộ xét nghiệm không được nhìn vào thị kính mà phải quan sát khoảng cách giữa tiêu bản và vật kính để tránh làm vỡ tiêu bản.

- Nhìn vào thị kính để tìm vi trường:

- + Hai tay xoay ốc vĩ cấp, nhẹ nhàng nâng thân kính lên (hoặc hạ mâm kính xuống); khi phát hiện vi trường thoáng qua thì điều chỉnh tiếp bằng ốc vĩ cấp để lấy hình ảnh được rõ nét. Muốn quan sát được tốt tiêu bản thì: mắt nhìn vào thị kính và một tay điều chỉnh ốc vĩ cấp sao cho hình ảnh quan sát luôn rõ nét, tay kia xoay ốc xe tiêu bản để chuyển dịch vị trí cần quan sát.
- + Cần phải soi tiêu bản một cách tuần tự, theo đường "dịch dắc" cho đến lúc nào tìm được hình thể vi khuẩn thì điều chỉnh ốc vĩ cấp để có hình thể vi khuẩn rõ nét nhất.

## 2.2. Bảo quản kính hiển vi có vật kính dầu

Vật kính dầu sau khi sử dụng, cần được lau sạch bằng một loại hoá chất (ví dụ xylene) có khả năng làm tan dầu bá hương.

- Lau sạch bụi hoặc hơi nước bám vào thân, đế, mâm kính... bằng khăn vải mềm, tránh làm xây xước kính.

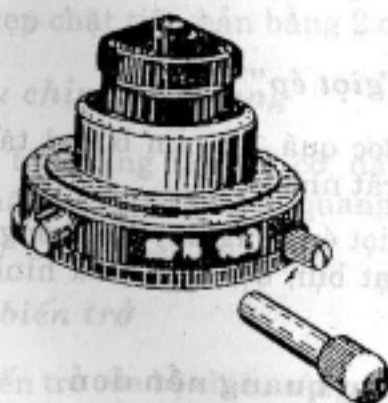
- Hạ tụ quang xuống (cho đến khi đường trượt được che kín nhất).
- Đóng chắn sáng.
- Để thân kính, mâm kính... vào tư thế "nghỉ".
- Cho kính vào hộp gỗ đựng kính có chất chống ẩm hoặc để kính ở phòng có máy điều hoà hoặc có máy hút ẩm.

### 3. SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN KÍNH HIỂN VI TỤ QUANG NỀN ĐEN

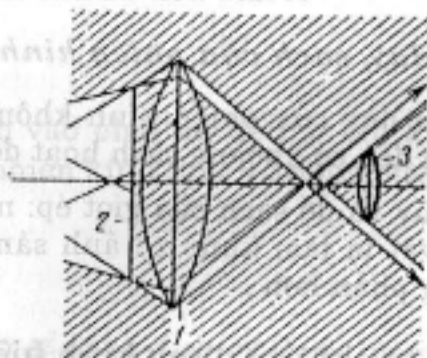
#### 3.1. Thế nào là kính hiển vi tụ quang nền đen?

Thông thường trong phòng thí nghiệm vi sinh học, ký sinh trùng học, huyết học,... chúng ta thường dùng kính hiển vi quang học với tụ quang nền trắng. Kính hiển vi có tụ quang nền trắng cho phép nghiên cứu các đối tượng trong chùm ánh sáng đi qua. Ngược lại kính hiển vi tụ quang nền đen được tạo ra trên cơ sở của việc chiếu sáng quan sát vi khuẩn hay vật thể bằng các tia sáng xiên. Lúc đó các tia sáng không chiếu thẳng vào vi khuẩn hay vật thể nên mắt không nhìn thấy được do vi trường vẫn hoàn toàn tối. Nếu tiêu bản có chứa vật thể nào đó (ví dụ vi khuẩn) thì các tia sáng xiên ở một mức độ nhất định sẽ phản xạ lại từ bề mặt của vật thể, đi lệch với hướng đi ban đầu của chúng và lọt vào vật kính. Lúc này trên nền đen có những vật được chiếu sáng trông rất rõ. Muốn chiếu sáng như vậy phải dùng một loại tụ quang đặc biệt có nền đen (Hình 2.1) thay cho bộ tụ quang nền trắng của kính hiển vi quang học thông thường. Vì vậy mà nó được gọi là *kính hiển vi nền đen*.

Tụ quang nền đen có cấu tạo đặc biệt ở phần giữa tối, do đó những tia sáng trung tâm đi từ gương đến sẽ bị giữ lại, chỉ có những tia sáng ở xung quanh được phản xạ lên mặt tiêu bản từ mép của thấu kính nằm bên trong bộ tụ quang (Hình 2.2).



Hình 2.1: Bộ tụ quang nền đen



Hình 2.2: Hướng đi của các tia sáng trong bộ tụ quang nền đen



**THƯ VIỆN  
HUB**

1. Tụ quang của bộ tụ quang  
2. Đèn đèn làm giữ lại các tia sáng trung tâm  
3. Vật kính

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

Khi soi kính hiển vi tụ quang nền đen có thể thấy rõ vi khuẩn (hoặc các vật thể) có đường kính thân chỉ vài phần trăm của micromet ( $\mu\text{m}$ ) tức là các vật thể nằm ngoài giới hạn thấy được của kính hiển vi quang học, ví dụ các xoắn khuẩn leptospira và giang mai. Tuy vậy kính hiển vi tụ quang nền đen chỉ quan sát được mặt ngoài của vi khuẩn hoặc vật thể chứ không thấy được các cấu trúc bên trong của vi khuẩn hoặc vật thể.

### 3.2. Sử dụng kính hiển vi tụ quang nền đen

Sử dụng kính hiển vi tụ quang nền đen chỉ đạt được kết quả tốt khi tuân theo các điều kiện sau đây:

#### 3.2.1. Độ mở của tụ quang nền đen

Độ mở của tụ quang nền đen phải lớn hơn độ mở của vật kính từ 0,2 – 0,4 đơn vị (xem sơ đồ), đường đi của tia sáng bên mép sẽ đập vào vật kính và như vậy sẽ làm giảm độ tương phản và làm tối hình ảnh nhận được, do đó khi quan sát kính hiển vi tụ quang nền đen người ta thường sử dụng các bộ tụ quang chìm với độ mở 1,2.

Khi sử dụng các vật kính có độ mở lớn muốn nhận được các hình ảnh rõ nét phải điều chỉnh màn chắn sáng, tức là hạ thấp độ mở xuống. Để đạt được mục đích này người ta bỏ vật kính ra khỏi bàn xoay rồi cài vào vật kính một màn chắn sáng đặc biệt, màn chắn sáng này được sản xuất cùng với bộ tụ quang nền đen.

#### 3.2.2. Độ chiếu sáng

Độ chiếu sáng của đèn phải để ở mức tối đa bởi vì bộ tụ quang nền đen chỉ cho một phần nhỏ của chùm tia sáng của nguồn sáng đi qua. Vì vậy, việc lấy ánh sáng đúng, sử dụng tối đa ánh sáng và nhất là định tâm điểm một cách chính xác có ý nghĩa rất lớn.

#### 3.2.3. Độ dày, sạch của phiến kính và "giọt ép"

Chiều dày của phiến kính không được quá 1,2 mm bởi vì tất cả các tụ quang nền đen có khoảng cách hoạt động rất nhỏ.

Độ dày và độ sạch của giọt ép: nếu giọt ép càng dày thì trong đó sẽ càng có nhiều vật lạ làm khúc xạ ánh sáng (hạt bụi, bọt khí...) và hình ảnh càng kém tương phản hơn.

### 3.3. Thao tác khi sử dụng kính hiển vi tụ quang nền đen

#### 3.3.1. Chuẩn bị tiêu bản "giọt ép"

Trên một phiến kính mỏng, nhỏ một giọt huyền dịch hoặc một giọt bệnh phẩm, đặt lá kính lên sao cho "giọt ép" sạch, không có bọt khí. Đặt lên mâm kính và điều chỉnh tiêu điểm bằng vật kính 8X, sau đó điều chỉnh tiêu điểm của tiêu bản bằng vật kính 40X.

### **3.3.2. Lắp tụ quang nền đen**

Lấy bộ tụ quang nền sáng và thị kính ra rồi tháo đi một vật kính (nếu trên bộ phận lắp vật kính đã có sẵn một lỗ không lắp vật kính và phía trên có dây nắp thì có thể sử dụng lỗ đó sau khi đã mở nắp dây và xoay để cho lỗ này về trục quang học).

### **3.3.3. Đóng màn chắn sáng**

Đóng màn chắn sáng đến mức tối đa, chỉ còn một lỗ nhỏ.

### **3.3.4. Mở chắn sáng**

Mở màn chắn sáng của bộ chiếu sáng. Che ống kính bằng một miếng kính mờ, nhẹ nhàng quay gương để có sự chiếu sáng đồng đều. Để gương ở vị trí bất động.

### **3.3.5. Lắp thị kính và vật kính 8X**

Lắp cẩn thận để không chạm vào gương, rồi lắp bộ tụ quang nền đen vào. Lắp thế nào để cho ốc trắng nằm về phía thân kính và 2 ốc điều chỉnh nằm về bộ chiếu sáng.

*Chú ý:* sau khi lắp bộ tụ quang nền đen vào nếu thấy có sự thay đổi (dù là nhỏ) vị trí của gương thì phải lấy bộ tụ quang ra và điều chỉnh ánh sáng lại.

### **3.3.6. Soi kính**

Đặt tiêu bản ra bên cạnh, giở một giọt dầu bá hương lên thấu kính ngoài cùng của bộ tụ quang - dầu làm cầu nối giữa tụ quang và phiến kính (chú ý không để tạo ra bọt khí), hạ thấp bộ tụ quang xuống một chút, đặt tiêu bản vào giữa, kẹp chặt tiêu bản bằng 2 cặp sắt của xe tiêu bản.

### **3.3.7. Điều chỉnh tụ quang**

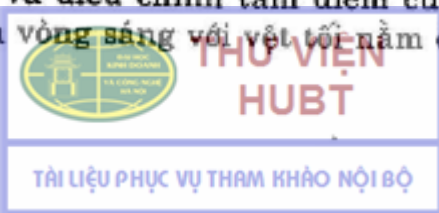
Nâng tụ quang lên hết cỡ, dầu cho vào phải đủ để lấp kín khoảng tiếp xúc giữa thấu kính của bộ tụ quang và phiến kính (lưu ý không được để tạo ra các bọt khí).

### **3.3.8. Tắt biến trở**

Tắt biến trở của bộ chiếu sáng (nếu có) để nhận được độ chiếu sáng tối đa.

### **3.3.9. Điều chỉnh tâm điểm**

Nhìn vào thị kính và điều chỉnh tâm điểm của bộ tụ quang. Dùng tay điều chỉnh hình ảnh của vòng sáng với vật tối nằm ở giữa và chính giữa diện nhìn.



### 3.3.10. Điều chỉnh hình ảnh

Khi điều chỉnh tâm điểm nếu phát hiện thấy vòng sáng thì nhìn vào thị kính rồi nâng hoặc hạ tụ quang xuống để cho nó ở vị trí sao cho trong trường sáng mất đi vết đen và thay vào vòng sáng chỉ có vết sáng khép kín.

**Lưu ý:** Nếu khi điều chỉnh tâm điểm, vết sáng đã hiện rõ thì không cần chuyển dịch tụ quang nữa.

Đưa vật kính 40X về trục quang học và quan sát tiêu bản.

## 3.4. Bảo quản kính hiển vi tụ quang nền đen

### 3.4.1. Lau bụi

Thường xuyên lau sạch bụi bám ở vật kính, thị kính, mâm kính, ...

### 3.4.2. Lau dầu

Sau mỗi lần sử dụng, kính cần được lau sạch dầu bá hương, để tránh làm hỏng hệ thống thấu kính do dầu ngấm vào.

### 3.4.3. Để kính về trạng thái cũ

Các thao tác khi lắp các bộ phận để dùng tụ quang nền đen đều được thực hiện tuần tự ngược lại để trả các bộ phận về vị trí cũ (chấn sáng, gương, hệ thống chiếu sáng, ...).

### 3.4.4. Bảo quản

Sau khi lau sạch, kính được cất giữ giống như cất giữ kính tụ quang nền trắng.

## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên những bộ phận chính của kính hiển vi quang học và nêu tác dụng của từng bộ phận.
2. Trình bày các thao tác để lấy ánh sáng tối đa khi sử dụng kính hiển vi có vật kính dầu.
3. Mô tả các động tác sử dụng kính hiển vi vật kính dầu để soi tiêu bản nhuộm vi khuẩn; động tác nào cần lưu ý nhất, tại sao?
4. Trình bày nguyên lý, cách sử dụng và tác dụng của kính hiển vi nền đen.
5. Trình bày các việc cần làm và ý nghĩa của từng việc nhằm bảo quản kính hiển vi.



THƯ VIỆN  
HUBT

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

# XỬ LÝ DỤNG CỤ THỦY TINH NHIỄM VI SINH VẬT

## MỤC TIÊU

1. Trình bày và thực hiện đúng thứ tự công việc xử lý hộp lồng, ống nghiệm, bình cầu, phiếu kính ... nhiễm vi sinh vật.
2. Trình bày và thực hiện đúng qui trình xử lý pipet đã sử dụng.

## 1. MỘT SỐ NÉT KHÁI QUÁT

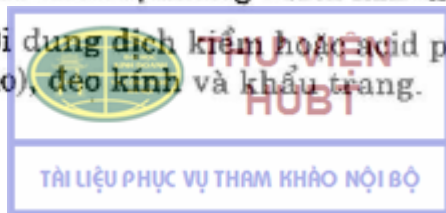
Xét nghiệm vi sinh vật cần nhiều loại dụng cụ khác nhau. Những dụng cụ lấy bệnh phẩm (ví dụ tăm bông) có vi sinh vật gây bệnh, sau khi sử dụng phải được thu gom để tiệt trùng, không vứt trực tiếp vào thùng rác. Những dụng cụ kim loại sau khi sử dụng (nhiễm vi sinh vật gây bệnh) phải được ngâm ngay vào dung dịch sát khuẩn, sau đó mới được rửa sạch. Những dụng cụ bằng nhựa (plastic) vô trùng dùng một lần (ví dụ hộp lồng, phiếu nhựa nhiều giếng ...) phải được kiểm tra trước khi sử dụng: xem túi đựng có nguyên vẹn không (không thủng, rách); sau khi sử dụng có nhiễm vi sinh vật gây bệnh phải được thu gom vào những túi plastic dày và hấp tiệt trùng trước khi bỏ vào thùng rác.

Những dụng cụ thủy tinh phải được xử lý đúng qui trình để có thể dùng lại được nhiều lần mà vẫn đảm bảo chất lượng.

Những dụng cụ thủy tinh như hộp lồng/đĩa petri, ống nghiệm, bình cầu ... đã sử dụng vào việc nuôi cấy hoặc đựng bệnh phẩm vi sinh vật phải được thu gom ngay sau khi sử dụng; xếp trong thùng có nắp đậy kín và hấp tiệt trùng hàng ngày. Muốn sử dụng lại những dụng cụ này chúng ta phải thực hiện một chuỗi những công việc khác nhau, vừa để giết chết vi sinh vật vừa làm cho thủy tinh sạch và trong. Thủy tinh trong suốt sẽ thuận lợi cho việc đọc kết quả xét nghiệm. Những dụng cụ được sử dụng đã lâu, thủy tinh bị mờ không nên dùng vào việc nuôi cấy phân lập hoặc làm kháng sinh đồ.

Các thao tác cọ rửa phải thận trọng vì thủy tinh dễ vỡ gây tai nạn. Khi rửa ống nghiệm bằng chổi lông, cần chọn loại chổi có đường kính vừa với đường kính ống nghiệm; động tác cọ rửa cần nhẹ nhàng tránh làm thủng đáy ống.

Mỗi khi làm việc với dung dịch kiềm hoặc acid phải thận trọng, đeo găng tay (cao su dày, cổ tay cao), đeo kính và khẩu trang.





## 2. XỬ LÝ DỤNG CỤ THỦY TINH NHIỄM VI SINH VẬT

Chuỗi thứ tự công việc xử lý dụng cụ thủy tinh đã qua nuôi cấy hoặc đựng bệnh phẩm vi sinh vật (được thu gom hàng ngày trong thùng chứa có nắp đậy) như sau:

1. Hấp tiệt trùng bằng lò hấp ở nhiệt độ  $120^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút (chú ý phải mở nắp thùng chứa). Cách vận hành lò hấp xem bài "*Các biện pháp tiệt trùng và khử trùng*".

2. Khi nhiệt độ lò hấp xuống khoảng  $50-60^{\circ}\text{C}$  phải lấy thùng chứa ra. Đổ chất thải (thạch) vào thùng chuyên dụng; không được đổ thạch trực tiếp xuống cống nước vì khi nguội, thạch sẽ đông lại làm tắc cống và rửa ngay dụng cụ bằng nước sạch (nếu không rửa sạch ngay khi còn nóng ẩm, phần thạch còn lại sẽ bám dính trên dụng cụ).

3. Ngâm dụng cụ vào bình (hoặc vại) chứa dung dịch NaOH công nghiệp có nồng độ  $\geq 40\%$ , trong ít nhất 24 giờ; nhằm tẩy các chất hữu cơ bám dính trên thủy tinh.

4. Rửa sạch bằng nước (nước máy, nước giếng sạch).

5. Ngâm dụng cụ trong dung dịch acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  công nghiệp có nồng độ  $\geq 20\%$ , nhằm trung hòa NaOH và tẩy những mảng bám chưa bị đánh tan bởi NaOH), trong ít nhất 24 giờ.

6. Rửa sạch dụng cụ bằng nước (nước sạch).

7. Tráng dụng cụ bằng nước cất một lần.

8. Ngâm qua nước cất nóng, phơi khô.

9. Đóng gói dụng cụ: nên đóng gói dụng cụ trong giấy bản hoặc giấy báo. Với hộp lồng (đường kính 9cm) nên xếp mỗi gói 5-6 hộp. Các ống nghiệm phải được nút bằng bông không thấm nước; nút bông không được quá chặt nhưng cũng không được quá lỏng, dễ thao tác rút nút ra và đóng nút lại được thuận lợi mà vẫn đảm bảo vô trùng; tùy theo đường kính có thể xếp 10-12 ống nghiệm trong một gói.

10. Hấp tiệt (vô) trùng ở nhiệt độ  $120^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút.

**Chú ý:** trước khi đưa dụng cụ vào lò hấp, phải dán băng (chỉ điểm hoá học) kiểm tra chất lượng tiệt trùng và ghi ngày tháng trên băng kiểm tra.

Dụng cụ đã tiệt trùng phải được cất giữ trong tủ riêng, đảm bảo kín và khô. Lưu trữ quá 03 ngày, dụng cụ không còn đảm bảo vô trùng.

## 3. XỬ LÝ PIPET (ỐNG HÚT)

Do cấu tạo, ống hút có đường kính nhỏ và dài, nhất là những pipet  $\leq 1\text{ml}$ , việc tiệt trùng và rửa sạch được tiến hành đặc biệt hơn so với các dụng cụ thủy tinh khác. Sau quá trình xử lý, pipet phải đạt yêu cầu là: trong ống hút không

còn cặn bẩn, thủy tinh sáng trong, pH trung tính. Khi ngâm, rửa và đóng gói, chú ý tránh cọ sát mạnh làm mất màu đánh dấu các vạch thể tích và tránh làm nứt đầu ống hút.

Quá trình xử lý pipet như sau:

1. Pipet sau sử dụng nhiễm vi sinh vật phải được cắm ngay đầu nhọn vào bình (bôcan) có sẵn dung dịch acid tiệt trùng ( $\geq 20\%$   $H_2SO_4$ ).

2. Dùng tấm rút nút bông ở đầu pipet trước khi nhúng ngập trong bôcan acid; lộn ngược đầu sau khoảng 24 giờ (nên dùng loại bôcan cao ngập  $\geq 2/3$  chiều dài pipet). Dung dịch acid nên cho thêm oxid chrom để tạo muối chromat có màu nâu đỏ, làm chỉ thị để nhận biết khi rửa; phải thận trọng khi làm việc với chrom vì muối chromat rất độc.

3. Sau khi ngâm khoảng 24 giờ, lấy pipet ra, (không nên để ống hút dính acid quá khô), rửa sạch acid bằng cách cho dòng nước chảy qua ống hút cho đến khi nước trong ống hút không còn màu vàng của muối chrom.

4. Tráng pipet bằng nước cất, sau đó ngâm trong nước cất (ít nhất 24 giờ) để làm sạch acid.

5. Để khô, đóng gói. Việc đóng gói pipet cần thực hiện như sau: đưa một ít bông không thấm nước vào đầu ống hút, nhằm ngăn ngừa dung dịch, đặc biệt là huyền dịch chứa vi sinh vật gây bệnh, có thể trực tiếp vào quả bóp. Mỗi pipet được đóng gói riêng trong một băng giấy cuốn, chú ý bảo vệ đầu nhọn ống hút. Nhiều pipet đã cuốn giấy được đóng vào hộp hoặc đóng thành gói to (tùy theo nhu cầu sử dụng).

6. Hấp tiệt trùng (xem ý 10 của mục 2).

### 3. XỬ LÝ PHIẾN KÍNH

Với các phiến kính soi tươi hoặc thử các test nhanh, thử ngưng kết ... sau khi sử dụng phải xử lý ngay. Nên ngâm ngay trong bôcan chứa dung dịch acid tiệt trùng như làm với pipet; làm như vậy thủy tinh sẽ sáng trong hơn ngâm vào các dung dịch sát khuẩn khác (ví dụ cloramin 5-10%).

Các phiến kính dần tiêu bản nhuộm có thuốc nhuộm và dầu bá hương (dầu cedre) được luộc trong dung dịch xà phòng hoặc dung dịch kiềm, rửa hết thuốc nhuộm và dầu; sau đó ngâm vào dung dịch NaOH và thực hiện thứ tự các công việc từ 3 đến 9 như trong mục 2.



## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Liệt kê thứ tự 10 công việc xử lý dụng cụ thủy tinh đã qua sử dụng để có thể dùng lại trong xét nghiệm vi sinh.
2. Tại sao phải ngâm dụng cụ thủy tinh trong dung dịch NaOH đặc và trong dung dịch acid?
3. Tại sao ống hút (pipet) đã sử dụng phải được ngâm ngay vào dung dịch acid mà không ngâm trong dung dịch cloramin? Tại sao dung dịch acid này lại nên cho thêm muối chromat?
4. Nêu cách xử lý phiến kính (lam kính) đã sử dụng trong labo vi sinh.



THƯ VIỆN  
HUBT

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

# CÁC BIỆN PHÁP TIỆT TRÙNG VÀ KHỬ TRÙNG

## MỤC TIÊU

1. Định nghĩa được tiệt trùng và khử trùng.
2. Trình bày được 6 biện pháp tiệt trùng và tác dụng của chúng.
3. Trình bày được 2 biện pháp khử trùng và tác dụng của chúng.
4. Vận hành được tủ sấy đúng quy trình.
5. Vận hành được nồi hấp đúng quy trình.

## 1. TIỆT TRÙNG (STERILIZATION)

### 1.1. Định nghĩa

Tiệt trùng là tiêu diệt tất cả các vi sinh vật hoặc tách bỏ chúng hoàn toàn ra khỏi vật cần tiệt trùng.

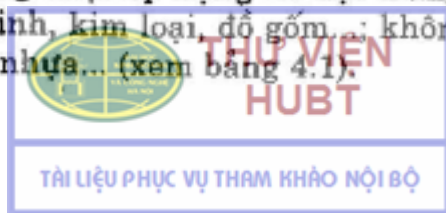
### 1.2. Các biện pháp tiệt trùng

Nguyên tắc chung là tất cả các biện pháp đều phải tiêu diệt được vi sinh vật và nha bào ở cả bên trong và bên ngoài vật cần tiệt trùng.

#### 1.2.1. Khí nóng khô

Để diệt vi sinh vật bằng khí nóng khô người ta thường dùng tủ sấy khô duy trì nhiệt độ từ  $160^{\circ}$  đến  $180^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 3-1 giờ. Vi sinh vật, kể cả nha bào đều bị tiêu diệt vì các thành phần hữu cơ bị huỷ hoại. Không khí là môi trường dẫn nhiệt kém nên nếu tủ sấy không có bộ phận tạo luồng khí chuyển động (quay vòng) cần phải duy trì nhiệt độ  $180^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ. Luôn luôn phải kiểm tra độ tiệt trùng bằng các chỉ điểm chuyên biệt.

Khí nóng khô thường được áp dụng để tiệt trùng các vật dụng chịu được nhiệt độ cao như: thủy tinh, kim loại, đồ gốm...; không dùng để tiệt trùng các vật dễ cháy như: cao su, nhựa... (xem bảng 4.1).

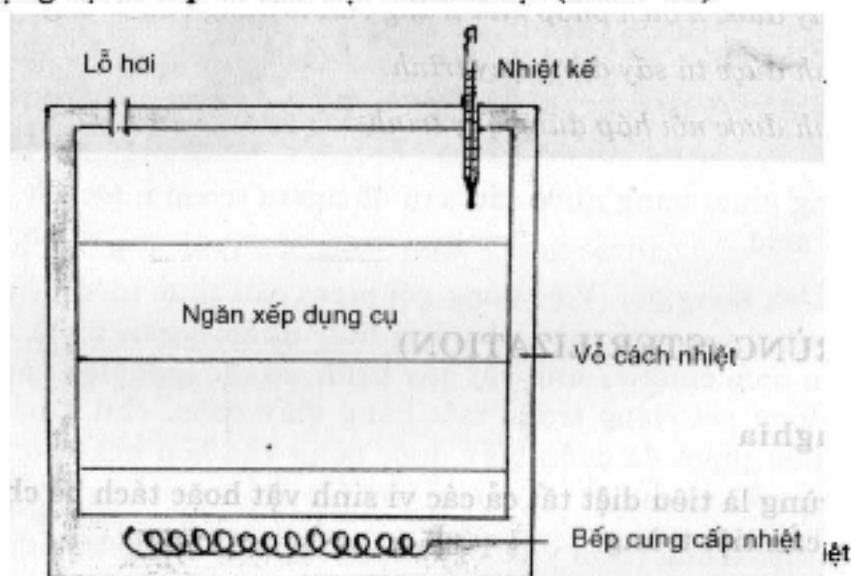


**Bảng 4.1.** Nhiệt độ và thời gian sấy tiệt trùng một số dụng cụ

Dụng cụ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)
Thủy tinh	160	60
Đồ gốm	160	60
Kim loại	160	160
Các chất dầu mỡ	160	160

**a. Cấu tạo của tủ sấy khô**

Tủ sấy khô có 3 bộ phận chính: nguồn cung cấp và điều hoà nhiệt, các ngăn xếp dụng cụ và lớp vỏ cách nhiệt (Hình 4.1).



**Hình 4.1.** Sơ đồ cấu tạo tủ sấy khô

**b. Quy trình sử dụng tủ sấy khô**

- Điều chỉnh nhiệt độ và thời gian thích hợp với dụng cụ được sấy.
- Dụng cụ cần sấy phải được cọ rửa sạch và khô.
- Tháo rời các bộ phận của dụng cụ (nếu được).
- Xếp các dụng cụ vào tủ: không được xếp sát đáy hoặc sát thành tủ và quá chặt.
- Đặt hoá chất hoặc băng chỉ thị màu để kiểm tra nhiệt độ.
- Đóng cửa tủ cẩn thận.
- Vận hành tủ (bật công tắc điện hoặc đóng cầu dao).
- Trong khi sấy phải thường xuyên theo dõi; không được mở cửa tủ hoặc cho thêm dụng cụ vào khi nhiệt độ đã lên cao.

- Chỉ lấy dụng cụ ra khỏi tủ sau khi đã ngắt điện và nhiệt độ trong tủ đã xuống dưới 50°C.

**Chú ý:** Vận hành tủ sấy phải thận trọng, tránh tai nạn lao động như bỏng...

### 1.2.2. Hơi nước căng

Hơi nước căng là hơi nước ở áp suất cao tương ứng với nhiệt độ đạt được trên 100°C; khi pha hơi cân bằng với pha lỏng của nước gọi là bão hoà. Hơi nước căng có tác dụng diệt vi sinh vật.

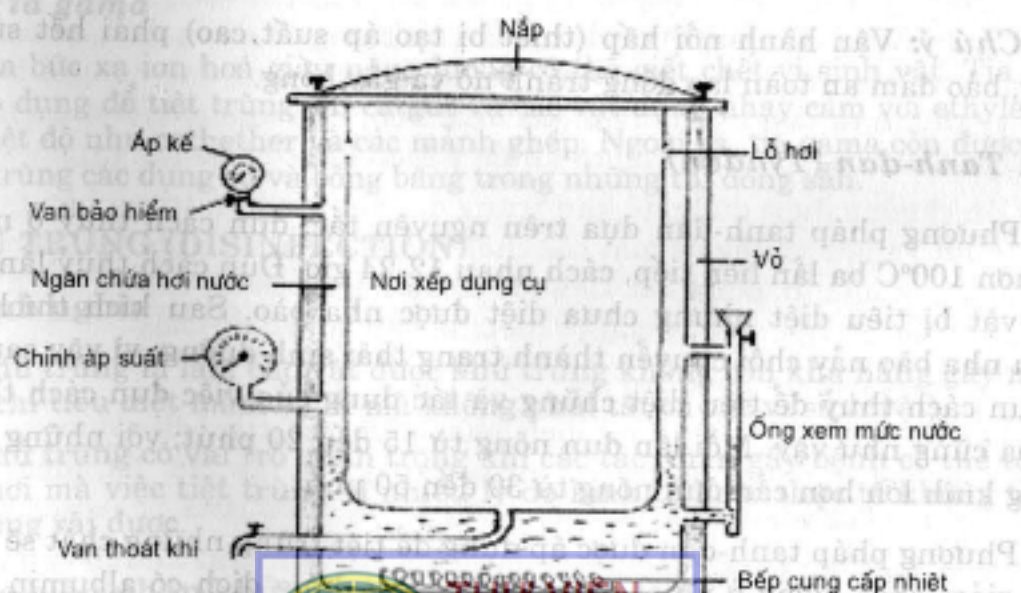
Nồi hấp/lò hấp (autoclave) là dụng cụ tạo hơi nước căng dùng để tiệt trùng. Biện pháp này thường được áp dụng cho các dụng cụ thủy tinh, kim loại, đồ vải, cao su, một số chất dẻo, chất lỏng và môi trường nuôi cấy.

**Bảng 4.2.** Áp suất, nhiệt độ và thời gian tiệt trùng một số dụng cụ

Dụng cụ	Áp suất (atm)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)
Đồ vải	1	120,5	30
Đồ cao su	1	120,5	15
Kim loại trong gói	1	120,5	30
Kim loại đồ hồ	1	120,5	15
Đồ thủy tinh	1	120,5	15
Môi trường nuôi cấy vi khuẩn	0,5 hoặc 1	111,4 120,5	30 15

#### a. Cấu tạo của nồi hấp ướt

Nồi hấp ướt có nhiều kiểu cách khác nhau nhưng cấu tạo đều tuân theo nguyên tắc chung: tạo hơi nước trong bình kín có áp suất cao (Hình 4.2).



Hình 4.2. Sơ đồ cấu tạo nồi hấp ướt  
TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

### *b. Quy trình sử dụng nồi hấp ướt*

- Dụng cụ cần tiệt trùng phải được cọ rửa sạch.
- Tháo rời các bộ phận của dụng cụ (nếu được).
  - + Xếp các dụng cụ vào nồi hấp sao cho hơi nước nóng tiếp xúc được với từng dụng cụ; các hộp hấp phải để hở lỗ thoát khí, bình phải để hở nắp.
- Đặt hoá chất hoặc băng chỉ thị màu để kiểm tra nhiệt độ.
  - + Đậy nắp kín (kiểm tra vòng đệm và thành nồi hấp, nếu có bụi cát phải lau sạch).
  - + Chọn nhiệt độ, áp suất, thời gian thích hợp với dụng cụ cần tiệt trùng.
- Kiểm tra mức nước, thiếu phải bổ sung bằng nước cất.
- Mở van xả hơi.
- Vận hành nồi hấp.
- Khi hơi nóng thoát ra được 5 đến 7 phút thì khoá van xả hơi.
  - + Trong quá trình vận hành không được cho thêm dụng cụ vào, phải thường xuyên theo dõi nếu có sự cố phải ngắt điện ngay, báo cho người phụ trách.
  - + Khi đủ thời gian vận hành (tính từ khi áp suất đạt yêu cầu), tắt nồi hấp.
  - + Chỉ lấy dụng cụ ra khỏi nồi hấp khi kim áp suất đã chỉ số 0. Không được chủ động hạ áp suất quá nhanh tránh gây "xục" các chất lỏng được tiệt trùng.

**Chú ý:** Vận hành nồi hấp (thiết bị tạo áp suất cao) phải hết sức thận trọng, bảo đảm an toàn lao động tránh nổ và gây bỏng.

### **1.2.3. Tanh-đan (Tyndan)**

Phương pháp tanh-đan dựa trên nguyên tắc: đun cách thuỷ ở nhiệt độ nhỏ hơn 100°C ba lần liên tiếp, cách nhau 12-24 giờ. Đun cách thuỷ lần đầu, vi sinh vật bị tiêu diệt nhưng chưa diệt được nha bào. Sau kích thích nhiệt, nhiều nha bào nảy chồi chuyển thành trạng thái sinh dưỡng; vì vậy sau 24 giờ lại đun cách thuỷ để tiêu diệt chúng và tác dụng của việc đun cách thuỷ lần thứ ba cũng như vậy. Mỗi lần đun nóng từ 15 đến 20 phút; với những bình có đường kính lớn hơn cần đun nóng từ 30 đến 50 phút.

Phương pháp tanh-đan được áp dụng để tiệt trùng những chất sẽ bị hỏng hoặc giảm chất lượng ở nhiệt độ  $\geq 100^{\circ}\text{C}$ , như dung dịch có albumin (đông ở 70°C và biến chất ở 100°C) hoặc các loại môi trường có glucid... .

### 1.2.4. Lọc vô trùng

Có hai kỹ thuật lọc vô trùng: lọc bằng màng lọc và lọc sâu.

#### a. Dùng màng lọc

Dùng màng lọc với các khe hở vô cùng nhỏ để giữ lại các vi sinh vật trên bề mặt. Những chất khí và lỏng nếu không thể dùng nhiệt độ để tiệt trùng được thì phải lọc vô trùng; ví dụ như vaccin, sản phẩm huyết thanh, môi trường nuôi cấy tế bào, các dung dịch nhạy cảm với nhiệt độ hoặc đồ uống, không khí và các chất khác.

#### b. Lọc sâu

Dòng chảy đi qua một lớp vật liệu có cấu tạo sợi, hạt. Việc giữ lại vi sinh vật dựa trên nguyên tắc gắn những vi sinh vật vào cấu tạo mạng, nhờ hiệu lực vật lý khác nhau nên có thể giữ lại được cả những vật thể rất nhỏ. Thông thường người ta dùng sợi thủy tinh để lọc không khí (khả năng giữ được vật thể lớn hơn  $0,5 \mu\text{m}$  là 99,95%) và dùng cây nến gốm để lọc chất lỏng.

So với các biện pháp vật lý để tiệt trùng thì lọc vô trùng có nhiều yếu tố không chắc chắn, nên chỉ dùng cho những thuốc hoặc các chất liệu không thể áp dụng được các biện pháp tiệt trùng khác.

### 1.2.5. Hoá chất

Các hoá chất người ta thường dùng để tiệt trùng là ethylenoxid và formaldehyd. Tiệt trùng bằng ethylenoxid ( $\text{CH}_2\text{OCH}_2$ ) là dựa trên phản ứng hoá học, nhờ hoạt tính của nguyên tử oxy trong cấu tạo phân tử. Ethylenoxid là một chất độc, gây dị ứng, kích thích mạnh niêm mạc và dễ cháy, ngoài ra nó còn là chất gây ung thư. Vì vậy, khi sử dụng phải hết sức thận trọng và để phòng nổ.

### 1.2.6. Tia gama

Tia bức xạ ion hoá giàu năng lượng có thể giết chết vi sinh vật. Tia gama được áp dụng để tiệt trùng chỉ catgút và các vật dụng nhạy cảm với ethylenoxid hay nhiệt độ như catheter và các mảnh ghép. Ngoài ra, tia gama còn được dùng để tiệt trùng các dụng cụ và bông băng trong những túi đóng sẵn.

## 2. KHỬ TRÙNG (DISINFECTION)

### 2.1. Định nghĩa

Khử trùng là làm cho vật được khử trùng không còn khả năng gây nhiễm trùng (chỉ tiêu diệt mầm bệnh mà không phải tất cả các vi sinh vật).

Khử trùng có vai trò quan trọng khi các tác nhân gây bệnh có thể tồn tại nhiều nơi mà việc tiệt trùng vì nhiều lý do kinh tế hoặc thực tế không thể sử dụng rộng rãi được.

### 2.2. Các biện pháp khử trùng

Người ta thường dùng 2 biện pháp khử trùng là biện pháp vật lý và biện pháp hoá học.





## 2.2.1. Biện pháp vật lý

### a. Khử trùng bằng nhiệt độ cao

Luồng hơi nước nóng có nhiệt độ 80°C- 100°C thường được dùng nhất vì nó giết được các tế bào sinh dưỡng ở trạng thái tự do trong vài phút. Phương pháp này thường được áp dụng để khử trùng quần áo, chăn màn, các dụng cụ đã dùng của người bệnh.

Người ta còn khử trùng bằng phương pháp Pasteur hoá, ví dụ như: Pasteur hoá sữa ở nhiệt độ 72°C trong 20 giây, nước quả ép ở nhiệt độ 62°C trong 30 phút.

### b. Tia cực tím (UV)

Tác dụng của tia cực tím dựa trên cơ chế: cấu trúc các phân tử của vi sinh vật như acid nucleic bị biến đổi khi hấp thụ tia bức xạ này. Sóng điện từ với bước sóng 13,6 - 400 nm, nhất là bước sóng 257 nm, có tác dụng khử trùng. Liều sử dụng là 100 - 500  $\mu\text{Wsec}/\text{cm}^2$  diệt được 90% đối với hầu hết các loài vi khuẩn. Tia UV chỉ dùng để khử trùng không khí, nước sạch hoặc vị trí nào đấy bị nhiễm trùng.

Để đảm bảo vô trùng trong bốc cấy vi sinh vật và phòng thí nghiệm người ta thường dùng 2 bóng đèn cực tím 15 W hoặc 1 bóng 30 W cho căn phòng 25 m<sup>3</sup>, đèn treo cao không quá 2 m, thời gian chiếu sáng ít nhất 1 giờ nhưng không được quá 8 giờ.

Tia UV có thể gây viêm kết mạc, giác mạc và ảnh hưởng đến sức khoẻ của người lao động. Khi chiếu xạ với cường độ 100 - 500  $\mu\text{Wsec}/\text{cm}^2$  cần được theo dõi để kiểm tra hiệu lực và ngăn ngừa ảnh hưởng đến con người.

## 2.2.2. Biện pháp hoá học

### a. Cồn (alcol)

Các hoá chất thường được dùng để khử trùng là dung dịch ethanol 80%, isopropanol 70% và n-propanol 60%. Những dung dịch đặc hơn do hút nước trong vi khuẩn ra mạnh nên hiệu quả kém hơn. Cồn không diệt được nha bào. Tác dụng diệt virus của cồn còn có nhiều ý kiến khác nhau.

Cồn thường được dùng để khử trùng da, nhất là khử trùng bàn tay trong phẫu thuật và lau những bề mặt các chất rắn khi làm vệ sinh. Ưu điểm là thời gian tác dụng nhanh, đơn giản, tiện lợi, có khả năng thấm vào da kể cả lỗ chân lông và tuyến mồ hôi, nhưng nhược điểm là bay hơi và dễ cháy.

### b. Phenol và dẫn xuất của nó

Ở nồng độ 0,5 - 4%, dung dịch phenol có thể tiêu diệt được vi khuẩn nhưng không diệt được nha bào và virus. Phenol có thể "ăn" da, niêm mạc và còn có thể gây độc thần kinh.

Người ta dùng chỉ số phenol để đánh giá tác dụng sát khuẩn của một hoá chất. Chỉ số phenol là tỷ số giữa nồng độ phenol thấp nhất và nồng độ chất sát khuẩn thấp nhất cùng có tác dụng như nhau trên một loài vi khuẩn trong một thời gian nhất định.

### c. Nhóm halogen

Tác dụng khử khuẩn do phản ứng oxy hoá và halogen hoá các chất hữu cơ. Phản ứng oxy hoá xảy ra nhanh mà không thuận nghịch, còn phản ứng halogen hoá xảy ra chậm hơn và không mạnh bằng. Những phản ứng này xảy ra với nhiều chất hữu cơ khác nhau, do đó sẽ làm giảm hoạt tính khử trùng trong những dung dịch có nhiều chất bản hữu cơ hay các chất oxy hoá và halogen hoá khác, nhất là amoniac. Halogen có phổ tác dụng rộng và thời gian tác dụng ngắn.

- Clor: được sử dụng nhiều ở cả dạng khí nguyên chất và dạng hợp chất hữu cơ hay vô cơ. Clor dùng để khử trùng nước ăn (nồng độ 0,1 - 0,3 mg/l), nước bể bơi (0,5 mg/l).
- Clorua calci thường được sử dụng nhất để khử trùng chất nôn, chất thải và dụng cụ thô (pha 1/15 với nước) hoặc rắc hố xí.
- Cloramin pha loãng 1% có khả năng khử trùng bàn tay trong 5 phút tác dụng, cho dụng cụ phải 20 phút. Khử trùng đồ vải và tẩy uế dùng dung dịch 1,5 - 2,5% trong thời gian 2 - 12 giờ. Cloramin thô được dùng để tẩy uế như clorua calci.
- Iod: dung dịch iod và cồn iod (7% I<sub>2</sub>, 3% KI, 90% cồn) được sử dụng nhiều để khử trùng da.

Nhược điểm của halogen là phản ứng không đặc hiệu xảy ra rất nhanh với nhiều chất hữu cơ khác nhau và khí clor còn có tính độc; có thể có người bị dị ứng với iod.

### d. Muối kim loại nặng

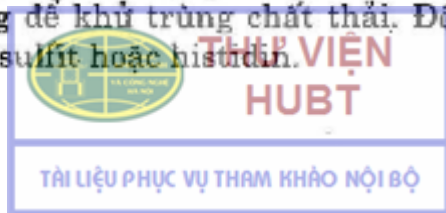
Hoạt tính kháng khuẩn theo thứ tự giảm dần: các muối của thủy ngân (Hg), bạc (Ag), đồng (Cu), kẽm (Zn). Các muối này chủ yếu có tác dụng ức chế vi khuẩn, không diệt được nha bào, virus; kém tác dụng đối với các vi khuẩn kháng acid. Trong y học, các hợp chất hữu cơ của Hg như phenyl-borat-thủy ngân được dùng sát trùng vết thương, da và niêm mạc.

### e. Aldehyd

Thường dùng formaldehyd dưới dạng dung dịch 0,5-5% và khí 5 gam/cm<sup>3</sup>, nó có tác dụng tiêu diệt cả vi khuẩn, nấm và virus; nếu đủ thời gian và ở nhiệt độ cao còn diệt được cả nha bào.

Dạng dung dịch dùng để lau chùi sàn nhà và đồ dùng. Dạng khí dùng để khử trùng không khí và máy móc lớn.

Formaldehyd kích thích da và niêm mạc, gây chảy nước mắt, có thể dẫn tới dị ứng và nghi ngờ có thể gây ung thư. Do làm tủa protein nên formaldehyd không dùng để khử trùng chất thải. Để trung hoà formaldehyd chúng ta dùng amoniac, sulfit hoặc histidin.



### f. Các chất oxy hoá và thuốc nhuộm vi khuẩn

Các chất như : oxy già ( $H_2O_2$ ), thuốc tím ( $KMnO_4$ ), xanh methylen... được pha thành dung dịch dùng làm thuốc sát khuẩn.

### g. Acid và base

Hầu hết các acid và base đều có tác dụng diệt khuẩn vì tính điện phân mạnh thành  $H^+$  và  $OH^-$ . Tuy từng loại vật liệu cần khử trùng mà chúng ta dùng nồng độ, loại acid và base cho thích hợp.

## 2.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng tác dụng của chất khử trùng

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả khử trùng nhưng quan trọng là những yếu tố sau:

- Nồng độ hoá chất không đủ.
- Thời gian tác dụng không đủ.
- Nhiệt độ (có liên quan tới thời gian tác dụng).
- Mật độ vi sinh vật tại nơi khử trùng.
- Môi trường xung quanh cản trở hoá chất ngấm tới vi sinh vật hoặc làm bất hoạt hoá chất (ví dụ: vi khuẩn lao trong đờm).
- Khả năng đề kháng của vi sinh vật (ví dụ: virus có lớp vỏ bao ngoài (lipid) dễ bị tiêu diệt bởi dung môi của lipid như cồn, phenol... hơn là những virus không có vỏ bao ngoài).

Vì vậy để phát huy hiệu quả của các chất khử trùng cần sử dụng đúng các loại hoá chất, đủ nồng độ và thời gian cần thiết tùy theo từng loại dụng cụ hoặc vật cần khử trùng.

## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Tiệt trùng là gì?
2. Kể tên 6 biện pháp tiệt trùng và nêu tác dụng của từng biện pháp.
3. Khử trùng là gì?
4. Trình bày biện pháp khử trùng bằng nhiệt độ cao và tia cực tím.
5. Kể tên các hoá chất thường được dùng trong khử trùng và tác dụng của mỗi loại.
6. Trình bày qui trình sấy khô.
7. Trình bày qui trình hấp ướt.



# KỸ THUẬT PHA MỘT SỐ DUNG DỊCH NHUỘM VÀ DUNG DỊCH THỬ - PHÁT HIỆN TÍNH CHẤT SINH VẬT HOÁ HỌC THƯỜNG DÙNG TRONG XÉT NGHIỆM VI SINH

## MỤC TIÊU

1. Liệt kê được các dung dịch nhuộm và dung dịch thử thường được sử dụng trong phòng xét nghiệm vi sinh.
2. Pha đạt yêu cầu các dung dịch: nhuộm Gram, nhuộm Ziehl-Neelsen và dung dịch thử Kovacs, dung dịch thử nitrit, dung dịch thử đỏ methyl.
3. Giải thích được ý nghĩa của những thành phần trong dung dịch nhuộm và dung dịch thử.

Nhờ các phương pháp nhuộm và soi kính hiển vi, chúng ta quan sát được hình thể, kích thước, tính chất bắt màu và cách sắp xếp của vi khuẩn.

Có hai phương pháp nhuộm vi khuẩn:

- Phương pháp nhuộm đơn: là phương pháp sử dụng một loại hóa chất màu để nhuộm vi khuẩn. Hóa chất nhuộm màu gì thì vi khuẩn sẽ bắt màu đó. Nhuộm đơn chỉ cho chúng ta biết được hình thể, kích thước và cách sắp xếp của vi khuẩn, không cho phép phân biệt được tính chất bắt màu khác nhau giữa các vi khuẩn.
- Phương pháp nhuộm kép: nhuộm kép là phương pháp nhuộm sử dụng từ hai loại hóa chất màu trở lên để nhuộm vi khuẩn. Phương pháp nhuộm kép gồm có nhiều kỹ thuật nhuộm khác nhau: nhuộm Gram, Ziehl-Neelsen, Neisser, Fontana-Tribondeau vv... Trong phạm vi bài này, chúng tôi chỉ giới thiệu cách pha các dung dịch nhuộm Gram và nhuộm Ziehl-Neelsen.

Kỹ thuật nhuộm Gram là kỹ thuật cơ bản nhất trong nhuộm vi khuẩn. Kỹ thuật này do *Christian Gram* xây dựng năm 1884, trong quá trình sử dụng đã được một số tác giả cải tiến các bước pha các dung dịch nhuộm, nhưng kết

quả nhuộm vi khuẩn giống nhau. Nhờ kỹ thuật nhuộm Gram và soi kính hiển vi, chúng ta biết được hình thể, kích thước, cách sắp xếp và bắt màu khác nhau giữa các vi khuẩn Gram-dương và các vi khuẩn Gram-âm.

## 1. KỸ THUẬT PHA CÁC DỤNG DỊCH NHUỘM GRAM (CỦA CHRISTIAN GRAM, 1884)

### 1.1. Dung dịch tím gentian (crystal violet)

Khi được nhuộm dung dịch này, các vi khuẩn sẽ bắt màu tím.

- Công thức:

+ Tím gentian	0,3g
+ Cồn ethanol (95%)	10ml
+ Acid phenic	1ml
+ Nước cất	100ml

- Cách pha:

Cho tím gentian và cồn vào lọ, lắc cho tới khi tím gentian được hoà tan hoàn toàn, sau đó cho acid phenic, cuối cùng cho nước cất và lắc trộn đều. Lọc dung dịch bằng giấy lọc. Bảo quản trong lọ thủy tinh.

### 1.2. Dung dịch lugol

Khi nhuộm dung dịch này, do thành phần trong vách tế bào của vi khuẩn Gram-dương dày, có nhiều lớp peptidoglycan hơn so với vi khuẩn Gram-âm, do đó iod có trong dung dịch lugol sẽ kết hợp với gentian tạo nên phức hợp iod-gentian bền vững không thể thấm ra ngoài, khi vi khuẩn bị tẩy màu bằng cồn. Vì vậy, vi khuẩn Gram-dương sẽ giữ được màu tím.

- Công thức:

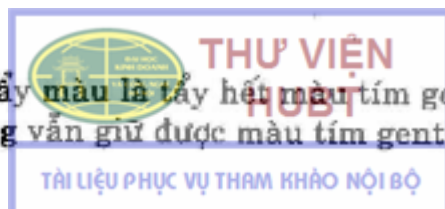
+ Iod metinic	1g
+ Kali iodua (KI)	2g
+ Nước cất	100ml

- Cách pha:

Cho KI và nước vào lọ, lắc cho tới khi KI được hòa tan hoàn toàn, sau đó cho iod metinic và để tủ ấm qua đêm cho tan hoàn toàn. Bảo quản trong lọ thủy tinh.

### 1.3. Chất tẩy màu

Mục đích của chất tẩy màu là tẩy hết màu tím gentian ở vi khuẩn Gram-âm, vi khuẩn Gram-dương vẫn giữ được màu tím gentian.



- Tẩy chậm: sử dụng cồn ethanol 95% (thường sử dụng nhất).
- Tẩy trung bình: sử dụng cồn ethanol + aceton (tỷ lệ 1:1).
- Tẩy nhanh: sử dụng aceton.

#### 1.4. Dung dịch fuchsin

Nhuộm dung dịch fuchsin để vi khuẩn Gram-âm sau khi bị mất màu ở giai đoạn tẩy màu sẽ bắt màu đỏ fuchsin.

- Công thức:

+ Fuchsin kiềm (base fuchsin)	0,2g
+ Cồn ethanol 95%	10ml
+ Acid phenic	1ml
+ Nước cất	100ml

- Cách pha:

Cho fuchsin và ethanol vào lọ, lắc cho tới khi fuchsin được hòa tan hoàn toàn, sau đó cho acid phenic, cuối cùng cho nước cất và lắc trộn đều. Lọc dung dịch bằng giấy lọc. Bảo quản trong lọ thủy tinh.

## 2. KỸ THUẬT PHA DUNG DỊCH NHUỘM GRAM (CỦA HUCKER CẢI TIẾN NĂM 1921)

### 2.1. Dung dịch tím gentian

#### 2.1.1. Dung dịch mẹ tím gentian

- Công thức:

+ Tím gentian	10 g
+ Cồn ethanol 95%	100ml

- Cách pha:

Cho tím gentian và ethanol vào lọ, lắc cho tới khi tím gentian được hòa tan hoàn toàn. Bảo quản trong lọ thủy tinh, để dung dịch ở nhiệt độ phòng, có thể sử dụng được trong vòng 1 năm.

#### 2.1.2. Dung dịch amonium oxalat 1%

- Công thức:

+ Amonium oxalat	4g
+ Nước cất	400ml



THƯ VIỆN  
HUBT

- Cách pha:

Cho amonium oxalat vào lọ, lắc cho tới khi amonium oxalat được hòa tan hoàn toàn. Bảo quản trong lọ thủy tinh, để dung dịch ở nhiệt độ phòng, có thể sử dụng được trong vòng 1 năm.

### **2.1.3. Dung dịch tím gentian để nhuộm**

- Công thức:

+ Dung dịch tím gentian mẹ 10ml

+ Dung dịch amonium oxalat (1%) 40ml

- Cách pha:

Lọc tím gentian mẹ vào một lọ thủy tinh, sau khi lọc xong thì lọc tiếp dung dịch amonium oxalat vào, lắc đều.

## **2.2. Dung dịch lugol**

### **2.2.1. Dung dịch lugol mẹ**

- Công thức:

+ Iod tinh thể (Iodine) 5g

+ Kali iodua (KI) 10g

+ Nước cất 100ml

- Cách pha:

Cho tất cả các thành phần vào lọ thủy tinh màu nâu, lắc cho tới khi các thành phần được hoà tan hoàn toàn.

### **2.2.2. Dung dịch natri bicarbonat – $\text{NaHCO}_3$ 5%**

- Công thức:

+ Natri bicarbonat 5g

+ Nước cất 100ml

- Cách pha:

Cho các thành phần vào lọ thủy tinh, lắc cho tới khi natri bicarbonat tan hoàn toàn.

### **2.2.3. Dung dịch lugol để nhuộm**

- Công thức:

+ Dung dịch lugol mẹ 30ml

+ Natri bicarbonat 5% 80ml

+ Nước cất 100ml



### 2.3. Chất tẩy màu

- Tẩy chậm : cồn ethanol 95%.
- Tẩy trung bình: cồn ethanol + acetone (tỷ lệ 1:1) .
- Tẩy nhanh: acetone.

### 2.4. Dung dịch fuchsin

- Công thức:

+ Fuchsin kiềm	0,2g
+ Cồn ethanol 95%	10ml
+ Acid phenic	5ml
+ Nước cất	95ml

- Cách pha:

- + Cho fuchsin kiềm và cồn ethanol vào lọ thủy tinh, lắc cho tới khi fuchsin tan hoàn toàn.
- + Cho acid phenic và nước cất vào lọ thủy tinh lắc trộn đều.
- + Trộn 2 dung dịch trên với nhau. Để 1-2 ngày ở nhiệt độ phòng sau đó lọc và sử dụng.

## 3. KỸ THUẬT PHA CÁC DUNG DỊCH NHUỘM ZIEHL - NEELSEN

Kỹ thuật nhuộm Ziehl-Neelsen được sử dụng để phát hiện các vi khuẩn thuộc họ Mycobacteriaceae (còn gọi là vi khuẩn kháng cồn, kháng acid, vì chúng có thể tồn tại trong môi trường có nồng độ cồn và acid nhất định mà không bị mất màu khi tẩy bằng cồn và acid trong kỹ thuật nhuộm Ziehl-Neelsen).

### 3.1. Dung dịch fuchsin

Khi nhuộm vi khuẩn bằng dung dịch fuchsin các vi khuẩn thuộc họ Mycobacteriaceae và các vi khuẩn khác đều bắt màu đỏ fuchsin.

- Công thức:

+ Fuchsin kiềm	1g
+ Cồn ethanol 95%	10ml
+ Acid phenic	5ml
+ Nước cất	100ml

- Cách pha:





Cho fuchsin và cồn ethanol vào lọ thủy tinh, lắc cho tới khi fuchsin tan hoàn toàn, sau đó cho acid phenic, cuối cùng cho nước cất và lắc trộn đều.

### 3.2. Chất tẩy màu (cồn + acid)

Khi tẩy màu bằng cồn và acid, các vi khuẩn thuộc họ Mycobacteriaceae vẫn giữ được màu đỏ fuchsin còn các vi khuẩn khác bị mất màu đỏ fuchsin.

- Công thức:

+ Cồn ethanol 95% 97ml

+ Acid phenic 3ml

Hoặc: Cồn ethanol 95% + acid HCl 3%, tỷ lệ 1:1

Hoặc: Cồn ethanol 95% 97ml + acid H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3ml

- Cách pha:

Cho từ từ acid vào cồn ethanol, vừa cho vừa lắc nhẹ.

### 3.3. Dung dịch xanh methylen

Nhuộm dung dịch xanh methylen để các vi khuẩn bị mất màu khi tẩy, qua bước này sẽ có màu xanh.

- Công thức:

+ Xanh methylen 2g

+ Cồn ethanol 95% 10ml

+ Acid phenic 2ml

+ Nước cất 100ml

- Cách pha:

Cho xanh methylen và cồn ethanol vào lọ thủy tinh, lắc cho tới khi xanh methylen tan hoàn toàn, sau đó cho acid phenic, cuối cùng cho nước cất, lắc trộn đều.

## 4. KỸ THUẬT PHA DUNG DỊCH NHUỘM XANH METHYLEN KIỂM (BASE METHYLEN BLUE)

Dung dịch xanh methylen kiểm ngoài mục đích dùng để nhuộm đơn, nhuộm nền sau khi nhuộm vi khuẩn kháng acid, còn sử dụng để nhuộm phát hiện vi khuẩn bạch hầu - *Corynebacterium diptheriae*.

**Dung dịch xanh methylen kiểm:**

Khi nhuộm dung dịch xanh methylen kiểm các vi khuẩn đều bắt màu xanh, hạt nhiễm sắc bắt màu xanh sẫm hơn.

- Công thức:

*Dung dịch A:*

- + Xanh methylen 0,3g
- + Cồn ethanol 95% 30ml

*Dung dịch B:*

- + Dung dịch KOH 0,01% 100ml

Trộn 2 dung dịch A và B, chứa trong chai sẫm màu.

## 5. KỸ THUẬT PHA DUNG DỊCH THỬ- PHÁT HIỆN INDOL

Indol là sản phẩm được chuyển hóa từ tryptophan. Các vi khuẩn có enzym tryptophanase và với sự có mặt của coenzym pyridoxal phosphat sẽ chuyển hóa được tryptophan tạo thành indol, acid pyruvic và ammonia. Indol nếu có trong môi trường, kết hợp với dung dịch Kovacs tạo thành phức hợp màu hồng, nổi trên mặt môi trường.

### 5.1. Dung dịch thử Kovacs

- Công thức:

- + Para-dimethylaminobenzaldehyd 10g
- + Cồn isoamylic 150ml
- + Acid hydrochloric đậm đặc (HCl) 50ml

- Cách pha:

Cho cồn isoamylic vào lọ thủy tinh màu nâu, sau đó cho từ từ para-dimethylaminobenzaldehyd vào cồn isoamylic, lắc cho tới khi para-dimethylaminobenzaldehyd tan hoàn toàn. Cuối cùng cho từng giọt acid HCl vào hỗn dịch trên, cho đến khi dung dịch có màu vàng là được. Khi cho acid HCl vào hỗn dịch, nên đặt lọ vào chậu nước lạnh, để tránh vỡ lọ.

- Bảo quản:

Dung dịch thử Kovacs bảo quản ở 4°C, sử dụng được trong vòng 1 năm. (Nếu cho HCl quá nhiều thì dung dịch sẽ có màu nâu như vậy là dung dịch pha không đạt yêu cầu, không sử dụng được).

### 5.2. Dung dịch thử Ehrlich

- Công thức:

- + Cồn ethanol 95% 95ml
- + Para-dimethylaminobenzaldehyd 1g
- + Acid hydrochloric 20ml



- Cách pha và bảo quản:

Thực hiện như đối với dung dịch thử Kovacs (xem mục 5.1).

## 6. KỸ THUẬT PHA DUNG DỊCH THỬ - PHÁT HIỆN NITRIT

Mục đích: phát hiện một số vi khuẩn có khả năng chuyển hoá nitrat thành nitrit. Nếu có, nitrit kết hợp với thuốc thử tạo ra sản phẩm màu đỏ.

- Công thức:

*Dung dịch A:*

+ Acid sulfanilic	8g
+ Acid acetic 5M	1000ml

*Dung dịch B:*

+ $\alpha$ - naphthylamin	5g
+ Acid acetic 5M	1000ml

Khi thử, trộn dung dịch A và B.

- Bảo quản:

Dung dịch được bảo quản ở nhiệt độ 4-22°C, có thể sử dụng trong vòng 1 năm.

## 7. PHA DUNG DỊCH THỬ NGHIỆM ĐỎ METHYL VÀ VP (VOGES-PROSKAUER)

Thử nghiệm đỏ methyl và VP kiểm tra sự có mặt của sản phẩm lên men đường glucose sinh acid và chuyển hoá đường tạo acetylmethylcarbinol (acetoin).

- Công thức dung dịch thử đỏ methyl:

+ Bacto methyl red	0,1g
+ Cồn ethanol 95%	300ml

Trộn đều và bổ sung thêm nước cất vừa đủ 500ml. Giữ trong chai nâu.

Khi thử nghiệm: cho 0,5ml thuốc thử vào ống canh thang đã nuôi cấy vi khuẩn 2,5ml; nếu chỉ thị màu chuyển đỏ là dương tính (tạo acid với pH < 6,0), chuyển màu vàng là âm tính (pH > 6,0).

- Công thức dung dịch thử VP (Voges-Proskauer):

*Dung dịch A:*

+ $\alpha$ - naphthol	5g
+ Cồn ethanol tuyệt đối	100ml

Hoà tan  $\alpha$  - naphthol trong một ít cồn, cho vào ống đong, rót cồn vừa đủ 100ml. Cất ở chai nâu, trong tủ lạnh.

### Dung dịch B:

- + Hydroxyd kali (KOH) 40g
- + Nước cất 100ml

Cân KOH nhanh; cho vào bình nước (<100ml) đặt trong chậu nước lạnh; rót sang ống đong, cho nước vừa đủ 100ml.

Khi thử nghiệm: cho dung dịch A trước (ví dụ 0,6ml vào ống canh thang đã nuôi cấy vi khuẩn 2,5ml), sau đó cho dung dịch B (0,2ml). Nếu có màu hồng là dương tính (có acetoin); không màu hoặc vàng là âm tính (không có acetoin).

## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Liệt kê các dung dịch nhuộm và dung dịch thử thường được sử dụng trong phòng xét nghiệm vi sinh?
2. Kể các dung dịch của bộ nhuộm Gram, nhuộm Ziehl-Neelsen và dung dịch thử Kovacs. Nêu ý nghĩa của từng loại dung dịch.
3. Nếu nồng độ các dung dịch nhuộm Gram được pha đặc hơn hoặc loãng hơn so với công thức mà qui trình nhuộm không thay đổi thì tính chất bắt màu của vi khuẩn sẽ bị ảnh hưởng như thế nào?



THƯ VIỆN  
HUBT

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

# ĐIỀU CHẾ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI KHUẨN

## MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên tắc điều chế các loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn.
2. Điều chế được môi trường thạch thường và môi trường canh thang từ các loại hoá chất đơn lẻ.

## 1. TẦM QUAN TRỌNG CỦA MÔI TRƯỜNG

Muốn nuôi cấy vi khuẩn gây bệnh trong phòng thí nghiệm cần phải có các môi trường đủ chất dinh dưỡng: đó là hỗn hợp các chất đạm, đường, muối khoáng và các vitamin thích hợp nhằm đảm bảo cho sự phát triển của vi khuẩn.

Việc pha chế các loại môi trường dinh dưỡng là một trong những khâu quan trọng nhất trong công tác xét nghiệm vi khuẩn, vì nếu môi trường không đảm bảo chất lượng sẽ cho những kết quả sai lệch trong chẩn đoán xác định các vi khuẩn gây bệnh. Vì vậy, để đảm bảo chất lượng của môi trường, việc pha chế môi trường phải được tiến hành một cách thận trọng.

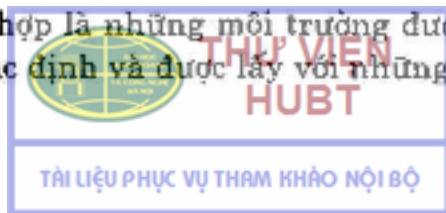
## 2. CÁC LOẠI MÔI TRƯỜNG

Có nhiều cách phân loại môi trường. Những cách phân loại thường được sử dụng là dựa vào thành phần, trạng thái vật lý và công dụng.

### 2.1. Dựa vào thành phần

Môi trường được chia thành 2 loại: môi trường tự nhiên và môi trường tổng hợp.

- Môi trường tự nhiên là môi trường được điều chế từ các sản phẩm có nguồn gốc động vật hoặc thực vật, ví dụ môi trường khoai tây, môi trường nước mạch nha.
- Môi trường tổng hợp là những môi trường được điều chế từ các chất hoá học tinh khiết, xác định và được lấy với những nồng độ cho trước.



## 2.2. Dựa vào trạng thái vật lý

Môi trường được chia ra 3 loại:

- Môi trường lỏng, ví dụ môi trường canh thang.
- Môi trường nửa lỏng nửa đặc, ví dụ môi trường thạch mềm.
- Môi trường đặc, ví dụ môi trường thạch thường.

## 2.3. Dựa vào công dụng

Dựa vào công dụng, môi trường được chia thành 5 loại:

### 2.3.1. Môi trường cơ bản

Môi trường cơ bản là những môi trường mà phần lớn các vi khuẩn có thể phát triển trong môi trường này và là nguyên liệu cơ bản để điều chế các môi trường khác. Môi trường cơ bản hay được sử dụng nhất là thạch thường và canh thang.

### 2.3.2. Môi trường vận chuyển và bảo quản bệnh phẩm

Trong những trường hợp: sau khi lấy bệnh phẩm không có điều kiện cấy ngay vào môi trường nuôi cấy thích hợp mà phải vận chuyển đi xa với một thời gian nhất định, bệnh phẩm phải được bảo quản trong môi trường vận chuyển để chuyển về phòng xét nghiệm. Một trong những môi trường vận chuyển hay được sử dụng đối với vi khuẩn đường ruột là môi trường Cary-Blair.

### 2.3.3. Môi trường tăng sinh

Môi trường tăng sinh được sử dụng trong một số trường hợp: vi khuẩn trong bệnh phẩm quá ít, chúng ta cần làm tăng số lượng trước khi cấy vào môi trường phân lập, như môi trường Mueller-Kauffman.

### 2.3.4. Môi trường phân lập

Phân lập nhằm mục đích tách vi khuẩn cần tìm ra khỏi bệnh phẩm có lẫn các tạp khuẩn. Vì vậy, trong môi trường phân lập ngoài chất dinh dưỡng còn có các chất đảm bảo sự phát triển ưu thế cho một loài hoặc một nhóm vi sinh vật nào đó, nhưng đồng thời lại có các chất hạn chế hoặc ức chế sự phát triển của những loài vi sinh vật khác (môi trường ức chế chọn lọc). Do đó mỗi loài hoặc mỗi nhóm vi khuẩn sẽ có môi trường phân lập khác nhau. Ví dụ môi trường Endo, McConkey, DCL... sử dụng để phân lập vi khuẩn đường ruột; môi trường Chapman để phân lập tụ cầu; môi trường Schoer để phân lập vi khuẩn bạch hầu, ...



THƯ VIỆN  
HUBT

### 2.3.5. Môi trường xác định tính chất sinh vật hoá học

Đây là môi trường sử dụng để phân biệt giữa loài vi khuẩn này với loài vi khuẩn khác. Vì vậy thành phần các môi trường này ngoài chất dinh dưỡng còn có các hoá chất đặc biệt để phát hiện khả năng chuyển hoá hoặc sản phẩm chuyển hoá của loại vi khuẩn cần định danh.

## 3. CÁC BƯỚC PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG TỪ CÁC HOÁ CHẤT RIÊNG LẺ

### 3.1. Chuẩn bị dụng cụ và hoá chất

- Dụng cụ dùng để pha chế môi trường phải bằng men sứ hoặc thủy tinh. Dung tích bình cần lớn gấp đôi thể tích môi trường định pha để có thể lắc kỹ.
- Dụng cụ phải được rửa sạch, không lẫn các chất khác và phải được sấy hấp vô trùng.
- Hoá chất dùng để pha chế môi trường phải tinh khiết và đảm bảo chất lượng, khô không vón cục, không đổi màu.

### 3.2. Cân đồng

Phải cân chính xác, đặc biệt những hoá chất gây ức chế vi khuẩn phải dùng cân chính xác tới miligam.

### 3.3. Hoà tan

Phải dùng nước cất 2 lần hoặc nước khử khoáng để pha chế. Tùy theo tính chất của hoá chất mà hoà tan ở nhiệt độ nóng hoặc lạnh. Cần lưu ý, mọi môi trường có thể thay đổi chất lượng nếu đun nóng quá sự cần thiết.

### 3.4. Điều chỉnh pH của môi trường

- Mỗi loại vi khuẩn chỉ phát triển tối ưu ở độ pH nhất định, vì vậy khi điều chế môi trường phải điều chỉnh pH thích hợp.
- Việc điều chỉnh pH của môi trường được tiến hành ở nhiệt độ 45-50°C nhằm mục đích: pH môi trường sau khi hấp và để nguội không bị thay đổi nhiều.
- Hoá chất sử dụng để điều chỉnh pH là dung dịch natri hydroxyd (NaOH) 10-12% và dung dịch acid hydrocloric (HCl) 10-12%.

### 3.5. Làm trong môi trường

Môi trường phải được làm trong để dễ quan sát sự phát triển của vi khuẩn.

- Đối với môi trường lỏng: lọc qua vải mịn hoặc giấy lọc.



- Đối với môi trường có nước thật: muốn môi trường được trong suốt phải dùng dung dịch NaOH điều chỉnh pH = 7,8- 8 và hấp lắng cặn ở 120°C trong 30 phút, để lắng cặn rồi lọc qua 2 lần giấy lọc.
- Phương pháp làm sáng màu: một số môi trường có màu sẫm có thể dùng than hoạt để loại màu. Tùy theo môi trường có màu sẫm nhiều hay ít mà có thể dùng 5-10g than hoạt cho một lít môi trường (đun sôi 10 phút rồi lọc qua giấy lọc hoặc vải dày).

### 3.6. Đóng môi trường vào ống hoặc bình nhỏ

Tùy theo yêu cầu sử dụng, có thể đóng môi trường vào ống nghiệm hoặc vào bình.

### 3.7. Tiệt trùng môi trường

- Phải tiệt trùng ngay sau khi đóng môi trường vào ống hoặc vào bình, vì nếu để lâu, các tạp khuẩn gặp nhiệt độ thích hợp sẽ phát triển làm ảnh hưởng đến chất lượng môi trường.
- Các môi trường có urê, hyposulfit dễ bị phân huỷ bởi nhiệt độ cao, phải tiệt trùng bằng lọc Seitz hoặc hấp cách thủy ở nhiệt độ 60-70°C.
- Các môi trường thông thường khác thường được tiệt trùng ở nhiệt độ 110°C trong 30 phút.

Sau khi tiệt trùng, áp suất trong lò giảm xuống (0) thì chuyển môi trường ra khỏi lò, không nên để môi trường hâm nóng lâu trong lò, càng không nên để môi trường qua đêm trong lò, vì như vậy môi trường sẽ bị sẫm màu và kém chất lượng.

### 3.8. Đĩa môi trường

Sau khi hấp tiệt trùng, để nhiệt độ xuống đến 45-50°C, đổ môi trường vào đĩa Petri (hộp lồng). Kỹ năng đổ tốt sẽ được đĩa môi trường có độ dày đúng, đều, mặt môi trường phẳng và không có bọt khí.

### 3.9. Kiểm tra vô trùng

Môi trường được để vào tủ ấm qua đêm để kiểm tra vô trùng (3-5% số lượng đã sản xuất).

### 3.10. Bảo quản môi trường

Nếu môi trường chưa sử dụng, chúng ta có thể bảo quản trong túi chất dẻo để ở nhiệt độ 4-10°C và dùng dần trong vòng 1 đến 2 tháng (nếu ở nhiệt độ phòng thì chỉ để được 1 đến 2 tuần).

Ngoài các môi trường được điều chế từ hóa chất đơn lẻ, hiện nay trên thị trường có rất nhiều loại môi trường tổng hợp, khi điều chế phải thực hiện đúng hướng dẫn của hãng sản xuất, ghi trên vỏ hộp và tiến hành theo các bước như pha chế môi trường từ hóa chất đơn lẻ (nhưng bỏ bước 3.4 và 3.5).



## 4. KỸ THUẬT PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG CƠ BẢN

### 4.1. Pha chế môi trường canh thang thường

#### 4.1.1. Pha chế từ nước thịt

- Thành phần:

- + Nước thịt 1000 ml
- + Pepton 10g
- + Muối tinh khiết (NaCl) 5g

- Quy trình:

- + Đun nóng, khuấy đều cho tan hết muối và pepton.
- + Điều chỉnh pH = 7,8 - 8
- + Hấp ở nhiệt độ 120°C trong 30 phút và để nguội cho lắng cặn.
- + Chắt lấy phần nước trong, chỉnh pH = 7,4 - 7,6
- + Lọc qua giấy lọc.
- + Đóng ống tùy theo mục đích sử dụng và hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 110°C trong 30 phút.

#### 4.1.2. Pha chế từ cao thịt

- Thành phần:

- + Cao thịt 5g
- + Pepton 10g
- + Muối tinh khiết (NaCl) 5g
- + Nước cất 1000 ml

- Quy trình:

- + Đun nóng, khuấy đều cho tan hết các hoá chất.
- + Điều chỉnh pH = 7,4 - 7,6 rồi lọc qua giấy lọc.
- + Đóng ống, hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 110°C trong 30 phút.

### 4.2. Pha chế môi trường thạch thường

#### 4.2.1. Pha chế từ nước thịt

- Thành phần:

- + Nước thịt 1000 ml
- + Pepton 10g



- + Muối tinh khiết (NaCl)                    5g
- + Thạch sợt                                      28-30g

- Quy trình:

- + Đun nóng nước thịt, pepton, muối cho tan.
- + Điều chỉnh pH = 7,8 - 8.
- + Thạch đã rửa sạch và cắt nhỏ cho vào hỗn hợp trên.
- + Hấp ở nhiệt độ 120°C trong 30 phút.
- + Để nguội cho lắng cặn.
- + Cắt lấy phần thạch trong phía trên, phân phối vào các bình cầu hoặc đun nóng chảy và đóng ống tùy mục đích sử dụng.
- + Hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 110°C trong 30 phút.

#### 4.2.2. Pha chế từ cao thịt

- Thành phần:

- + Cao thịt                                        5g
- + Pepton                                         10g
- + Muối tinh khiết (NaCl)                    5g
- + Thạch sợt                                      28-30g.
- + Nước cất                                       1000 ml.

- Quy trình:

- + Đun sôi cho hoá chất tan hoàn toàn, chú ý khuấy đều để thạch không bị cháy.
- + Điều chỉnh pH = 7,4 - 7,6.
- + Đóng ống tùy mục đích sử dụng.
- + Hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 110°C trong 30 phút.

#### 4.3. Môi trường nitrat

- Kali nitrat (KNO<sub>3</sub>)                        0,2g
- Pepton                                         5g
- Nước cất                                       1000 ml

Đóng môi trường vào ống nghiệm và tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.



## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên ba cách phân loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn.
2. Dựa vào công dụng, môi trường nuôi cấy vi khuẩn được chia thành mấy loại? Cho biết công dụng của mỗi loại.
3. Liệt kê các bước điều chế môi trường từ hoá chất đơn lẻ và cho biết nội dung chính trong mỗi bước.
4. Trình bày các bước điều chế môi trường canh thang từ cao thịt.
5. Trình bày các bước điều chế môi trường thạch thường từ cao thịt.



THƯ VIỆN  
HUBT

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

# THAO TÁC VÔ TRÙNG

## MỤC TIÊU

1. Trình bày được tầm quan trọng của thao tác vô trùng trong phòng xét nghiệm vi sinh vật.
2. Thực hiện đúng một số thao tác vô trùng cơ bản trong phòng xét nghiệm vi sinh vật.

## 1. KHÁI NIỆM VÀ TẦM QUAN TRỌNG

### 1.1. Khái niệm

Thao tác vô trùng là tất cả những việc làm trong quá trình thực hiện một qui trình kỹ thuật, không để cho vi sinh vật từ môi trường hoặc từ người thực hiện nhiễm vào đối tượng, vật liệu xét nghiệm và ngược lại.

### 1.2. Tầm quan trọng

Thao tác vô trùng thuộc vào những thao tác cơ bản nhất trong phòng xét nghiệm vi sinh vật. Nếu không thực hiện đúng thao tác vô trùng có thể dẫn đến những hậu quả sau:

- Hỏng vật liệu xét nghiệm: Môi trường nuôi cấy vi sinh vật nếu bị bội nhiễm và không được bảo quản trong lạnh thì sẽ nhanh chóng bị hỏng. Tất cả các môi trường nuôi cấy đều đòi hỏi phải vô trùng. Trong quá trình sản xuất môi trường có một số khâu không đòi hỏi vô trùng tuyệt đối, nhưng cuối cùng môi trường đều phải được hấp vô trùng. Khi những môi trường đã hấp vô trùng này được phân phối ra các đĩa petri hay các ống nghiệm đòi hỏi phải thực hiện thao tác vô trùng nghiêm ngặt. Ngoài môi trường nuôi cấy, các sinh phẩm như kháng huyết thanh, kháng nguyên, bệnh phẩm và một số hoá chất... cũng có đủ điều kiện cho vi sinh vật bội nhiễm phát triển và làm hỏng.
- Không đánh giá được kết quả hoặc làm sai lệch kết quả: Nếu vật liệu xét nghiệm bị bội nhiễm từ trước không được kiểm tra phát hiện, hoặc bị bội nhiễm trong quá trình thực hiện kỹ thuật, có thể làm hỏng hoàn toàn xét

thực nghiệm không đánh giá được kết quả. Sự bội nhiễm cũng có thể làm sai lệch kết quả mà ta không biết. Khi lấy bệnh phẩm hoặc trong quá trình phân lập nếu bị bội nhiễm, vi sinh vật bội nhiễm có thể phát triển nhanh chóng lấn át vi sinh vật là căn nguyên của bệnh nhiễm trùng. Đối với những vi sinh vật gây bệnh cơ hội nhiều khi rất khó xác định vi sinh vật "bắt" được có phải là căn nguyên hay chỉ là bội nhiễm. Nếu môi trường xác định tính chất hoá sinh bị bội nhiễm sẽ dẫn đến định danh sai, nhiều khi làm cho kết quả xác định này không phù hợp với một vi sinh vật nào. Động vật thí nghiệm được sử dụng trong phòng nghiên cứu vi sinh với nhiều mục đích khác nhau: phân lập vi sinh vật, nghiên cứu khả năng gây bệnh của vi sinh vật, thử nghiệm một sinh phẩm mới được sản xuất... Nếu động vật bị nhiễm trùng do bội nhiễm trong quá trình tiêm truyền thì kết quả sẽ không thể đánh giá được hoặc bị đánh giá sai lệch.

- Làm mất hoặc biến đổi vi sinh vật đang lưu giữ: Một trong các phương pháp lưu giữ vi sinh vật là cấy vi sinh vật vào môi trường thích hợp, sau khi vi sinh vật phát triển thì giữ trong lạnh và được cấy chuyển định kỳ sang môi trường mới. Quá trình cấy chuyển phải bảo đảm vô trùng. Nếu bị bội nhiễm, chủng đang lưu giữ có thể bị lấn át mất hẳn hoặc có sự trao đổi vật liệu di truyền với chủng bội nhiễm.
- Ô nhiễm môi trường: Vi sinh vật sống từ bệnh phẩm, từ môi trường nuôi cấy có thể gây nhiễm phòng xét nghiệm, từ đó có thể gây nhiễm ra môi trường sống bên ngoài.
- Gây nhiễm trùng cho cán bộ y tế và bệnh nhân: Không thực hiện đúng thao tác vô trùng khi tiến hành kỹ thuật, người làm xét nghiệm có thể bị nhiễm trùng. Không thực hiện đúng thao tác vô trùng khi lấy mẫu xét nghiệm có thể gây nhiễm trùng cho bệnh nhân.

## 2. ĐIỀU KIỆN THỰC HIỆN THAO TÁC VÔ TRÙNG

### 2.1. Phòng xét nghiệm

- Khử trùng: Phòng xét nghiệm phải được vệ sinh sạch sẽ. Bàn làm việc được lau bằng hoá chất sát trùng thích hợp. Chiếu tia cực tím trước khi tiến hành xét nghiệm (xem bài "*Các biện pháp tiệt trùng và khử trùng*").
- Không có luồng gió lưu thông: Khi đang làm việc tất cả các cửa đều phải được đóng kín và không sử dụng quạt.

### 2.2. Các bậc vô trùng

Sử dụng khi phòng thí nghiệm không thật bảo đảm vô trùng hoặc khi đòi hỏi mức độ vô trùng nghiêm ngặt.



### 2.2.1. Loại bốt nhỏ đơn giản

Là loại bốt nhỏ có 2 (hoặc 4) lỗ đủ rộng để một (hoặc 2 người) đưa tay vào thực hiện các kỹ thuật. Bốt được khử trùng bằng cách xông hoá chất thích hợp hoặc chiếu tia cực tím.

### 2.2.2. Bốt hiện đại (Laminar)

Là bốt có màng lọc tạo luồng khí vô trùng đẩy nhẹ liên tục từ phía trong bốt ra phía người làm xét nghiệm.

### 2.3. Đèn để khử trùng

Đèn cồn hoặc đèn hơi (để đơn giản, trong các phần sau chỉ nói đèn cồn) là phương tiện không bao giờ được thiếu trong các phòng xét nghiệm vi sinh vật. Ngọn đèn phải đủ lớn và cháy đều (không bập bùng).

### 2.4. Các dụng cụ vô trùng

Các dụng cụ sử dụng trong phòng xét nghiệm vi sinh như đĩa petri, ống nghiệm, bình cầu, pipet ... đều phải được tiệt trùng.

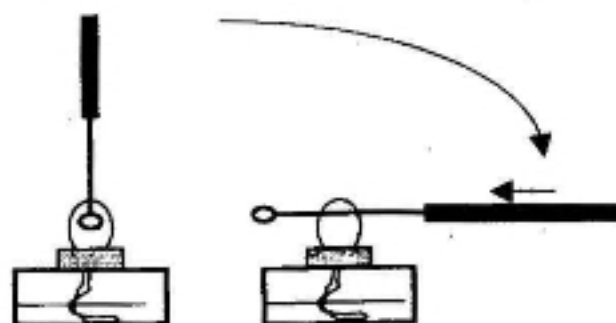
### 2.5. Trang bị cho người làm xét nghiệm

Người làm xét nghiệm phải mặc áo choàng, đội mũ và đeo khẩu trang.

## 3. MỘT SỐ THAO TÁC VÔ TRÙNG

Không phải tất cả các kỹ thuật tiến hành trong phòng xét nghiệm vi sinh đều đòi hỏi thao tác vô trùng. Một số kỹ thuật tiến hành nhanh, đọc kết quả sau một thời gian ngắn và sử dụng các vật liệu không gây nhiễm trùng thì không đòi hỏi thao tác vô trùng. Sau đây mô tả một số thao tác vô trùng cơ bản thường dùng trong phòng xét nghiệm vi sinh vật.

### 3.1. Tiệt trùng que cấy



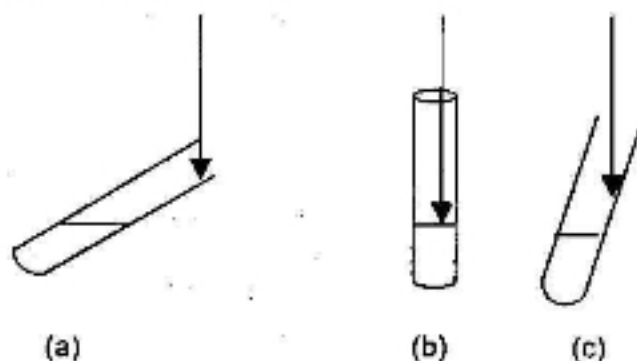
(a) (b)  
Hình 7.1. Đốt que cấy trên ngọn lửa đèn cồn

- Tiệt trùng que cấy trước khi lấy mẫu xét nghiệm: Trước tiên que cấy được giữ đứng thẳng, để cho vòng tròn đầu kim loại "chìm" trong nửa trên của ngọn đèn (Hình 7.1a), khi đầu que nóng đỏ thì cho que cấy nằm ngang rồi đẩy que cấy để tiệt trùng tiếp phần thân kim loại (Hình 7.1b).
- Tiệt trùng que cấy sau khi sử dụng: Sau khi sử dụng que cấy phải được khử trùng ngay trước khi cắm lên giá. Động tác giống như đốt que cấy trước khi lấy vi khuẩn. Đoạn que cấy được đốt phải cao hơn phần que cấy đã đưa vào trong lòng ống nghiệm, vì có thể bị chạm vào phía trong miệng ống nghiệm.

## 3.2. Quy trình thao tác vô trùng với ống nghiệm

### 3.2.1. Cắm ống nghiệm khi mở nút

Trước khi mở nút (hoặc mở nắp, để đơn giản trong các phần sau chỉ nói nút), ống nghiệm phải được cầm nghiêng một góc nhỏ hơn 45 độ so với mặt phẳng ngang (Hình 7.2a). Tư thế này được duy trì trong suốt quá trình thao tác, cho đến khi ống nghiệm đã được nút lại. Nếu ống nghiệm mở ở tư thế đứng thẳng hoặc nghiêng một góc lớn (Hình 7.2b và 7.2c) bụi sẽ rơi vào trong lòng ống. Khi nghiêng góc nhỏ, bụi cũng có thể rơi vào phía trong nhưng sẽ bám ở phần thành gần miệng ống và sẽ được khử trùng trước khi nút ống nghiệm (xem mục 4.2.2.).



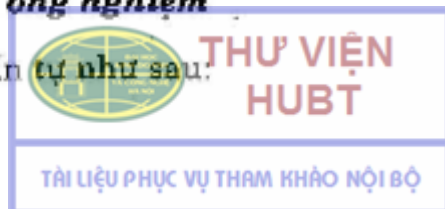
Hình 7.2. Tư thế cầm ống nghiệm khi mở nút: (a) đúng; (b) và (c) sai.

### 3.2.2. Tiệt trùng miệng ống nghiệm

Ngay sau khi mở và trước khi nút, ống nghiệm phải được hơ trên ngọn lửa đèn cồn. Hơ miệng ống nghiệm nhằm mục đích tiêu diệt các vi sinh vật bám ở miệng và phần thành ống sát miệng. Hơ phải đủ nóng, vừa hơ vừa xoay để toàn bộ miệng ống được nóng đều. Hơ nóng quá sẽ làm nứt ống thủy tinh hoặc làm méo ống nhựa.

### 3.2.3. Lấy vi khuẩn từ ống nghiệm

Được thực hiện tuân tự như sau:



- Tay trái (mô tả cho người thuận tay phải): Dùng ngón trỏ và ngón cái cầm ống nghiệm, đáy ống được đặt vào hõm giữa 2 ngón. Cầm như vậy vừa chắc chắn, vừa có thể nhìn rõ toàn bộ ống nghiệm.
- Tay phải: Dùng ngón cái, ngón trỏ và ngón giữa cầm que cấy; ngón út kẹp nút bông, vừa rút vừa xoay. Nút ống nghiệm không được để xuống mặt bàn, luôn luôn được giữ trên tay, phần nút trong lòng ống không được chạm vào da tay hoặc bất kỳ vật dụng gì khác.
- Tiệt trùng miệng ống nghiệm ngay sau khi mở nút (xem mục 3.2.2).
- Đưa que cấy vào ống nghiệm lấy vi khuẩn. Với môi trường lỏng thì nhúng đầu que cấy vào huyền dịch rồi kéo nhẹ lên sao cho được một vòng màng. Với thạch nghiêng thì cho đầu que cấy chạm vào khuôn lác cần lấy. Khi đưa que cấy ra khỏi ống nghiệm không để đầu que cấy chạm vào thành ống.
- Tiệt trùng miệng ống nghiệm (xem mục 3.2.2), rồi nút bông, vừa nút vừa xoay. Trong khi đó tay phải vẫn giữ yên que cấy không để chạm vào bất kỳ vật gì và không để vi khuẩn bắn ra ngoài.
- Tay trái lấy dụng cụ cần thiết (phiến kính, đĩa môi trường...) để làm tiếp công việc.
- Tiệt trùng que cấy (xem mục 3.1) rồi cắm vào giá.

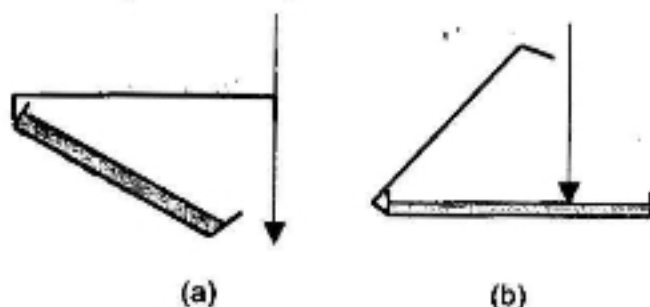
### 3.3. Thao tác vô trùng với các bình

Cách cầm bình khi mở nút và cách hơ để khử trùng miệng bình cơ bản giống thao tác đối với ống nghiệm.

### 3.4. Thao tác vô trùng với đĩa petri

#### 3.4.1. Cách cầm đĩa petri khi mở nắp

Khi mở nắp đĩa petri, để nắp nằm ngang, nửa dưới mở tạo với nắp một góc khoảng  $30^\circ$ , như vậy hình chiếu của nắp sẽ che kín mặt đĩa (Hình 7.3a). Nếu hình chiếu của nắp không che kín mặt đĩa, bụi có thể rơi vào môi trường nuôi cấy gây bội nhiễm (Hình 7.3b).

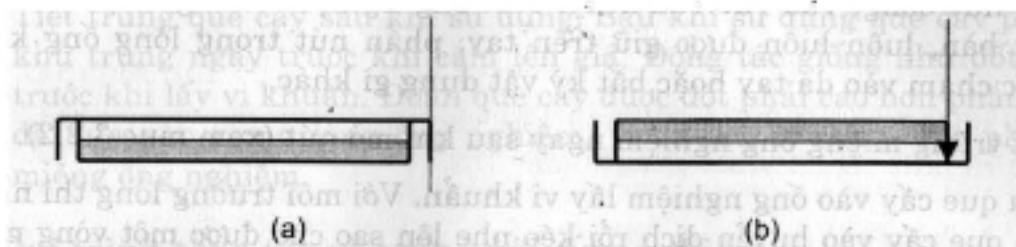


Hình 7.3. Đĩa petri khi mở nắp đúng (a) và khi mở nắp sai (b)  
(Các mũi tên chỉ đường bụi rơi khi không khí tĩnh)



### 3.4.2. Cách để đĩa petri trên bàn

Khi đĩa petri không được gói để trên bàn thì nắp phải ở trên (Hình 7.4a). Nếu để đĩa lật ngược (Hình 7.4b) bụi sẽ rơi vào khe giữa nắp và đĩa, rồi có thể rơi vào môi trường nuôi cấy khi đĩa được đặt xuôi trở lại.



Hình 7.4. Đĩa petri đặt ở trên bàn ở tư thế đúng (a) và sai (b)  
(Các mũi tên chỉ đường bụi rơi khi không khí tĩnh).

### 3.4.3. Cách để đĩa petri trong tủ ẩm

Sau khi đã cấy vi khuẩn hoặc đã làm kháng sinh đồ, đĩa petri được đặt ngược trong tủ ẩm (nắp ở phía dưới) để hạn chế sự bay hơi nước từ môi trường thạch.

## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Hãy liệt kê và lý giải những hậu quả do không thực hiện đúng thao tác vô trùng trong xét nghiệm vi sinh?
2. Để có thể thực hiện được thao tác vô trùng trong xét nghiệm vi sinh cần phải đảm bảo những điều kiện cơ bản gì?
3. Hãy mô tả cách tiệt trùng que cấy, miệng ống nghiệm hoặc bình cầu?
4. Hãy mô tả tư thế đúng của ống nghiệm và bình cầu khi mở nút, đĩa petri khi mở và khi đậy nắp? Giải thích lý do?

### Tự học tại phòng xét nghiệm

Tự thực hiện các thao tác vô trùng sau đó đọc lại tài liệu, đối chiếu để phát hiện đúng sai; có sự quan sát đánh giá của bạn khác càng tốt.

# CẤY VI KHUẨN VÀO CÁC LOẠI MÔI TRƯỜNG

## MỤC TIÊU

1. Trình bày đúng qui trình cấy vi khuẩn vào môi trường đặc, môi trường lỏng và thạch mềm.
2. Thực hiện được kỹ thuật cấy vi khuẩn vào môi trường đặc, môi trường lỏng và thạch mềm.

Cấy vi khuẩn là kỹ thuật đưa vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy để cho chúng phát triển nhằm mục đích phân lập, xác định tính chất, làm tăng số lượng, lưu giữ vi khuẩn...

## 1. CẤY VI KHUẨN VÀO MÔI TRƯỜNG ĐẶC

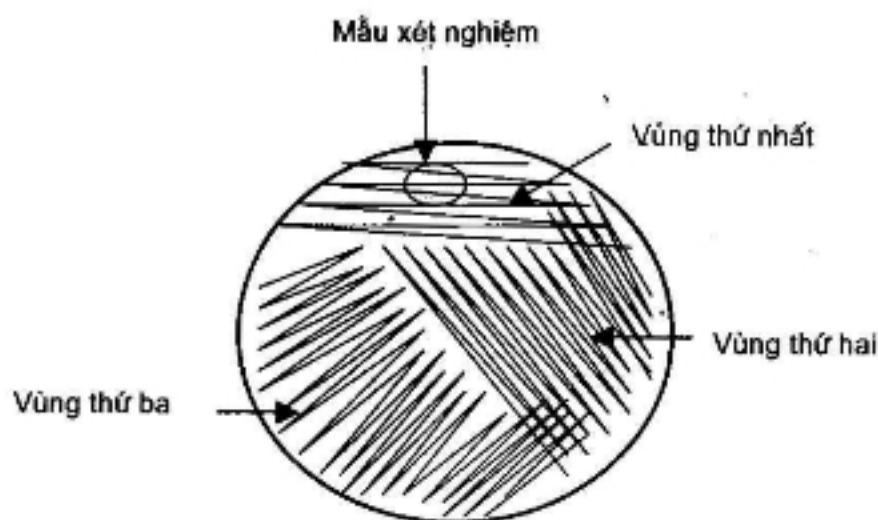
### 1.1. Cấy phân vùng trên môi trường phân lập

Phân lập một loại vi khuẩn là kỹ thuật nhằm tách vi khuẩn đó từ một mẫu xét nghiệm có thể có nhiều loại vi khuẩn khác nhau. Kết quả của quá trình này là có được vi khuẩn thuần nhất. Môi trường để phân lập vi khuẩn có thể chia thành 2 loại: có và không có chất ức chế chọn lọc.

Kỹ thuật cấy phân vùng được thực hiện theo trình tự sau (Hình 8.1):

- Lấy mẫu cần phân lập vi khuẩn đưa vào môi trường: Dùng que cấy vô trùng lấy mẫu đặt vào một vị trí gần rìa đĩa môi trường - nếu mẫu xét nghiệm ở thể lỏng và môi trường phân lập có chất ức chế chọn lọc thì nên lấy 2 hoặc 3 quai cấy (vòng ở đầu que cấy) hoặc dùng pipet Pasteur nhỏ 1 giọt - sau đó dàn thành một đám nhỏ khoảng 1 cm<sup>2</sup>. Nếu bệnh phẩm đã được lấy bằng tăm bông thì lăn đầu tăm bông trên một diện tích môi trường khoảng 1 cm<sup>2</sup>.
- Tạo vùng thứ nhất: Dùng que cấy đã tiết trùng rìa qua nơi đã đặt mẫu xét nghiệm tạo thành một vùng chiếm khoảng 1/4 diện tích đĩa môi trường.
- Tạo vùng thứ hai: Đốt que cấy để tiết trùng sau đó rìa để tạo vùng thứ hai. Những đường rìa đầu tiên cắt vào một đầu các đường rìa cuối của

vùng thứ nhất. Diện tích vùng thứ hai chiếm khoảng gần 1/3 diện tích đĩa môi trường.



Hình 8.1. Sơ đồ cây phân vùng trên đĩa môi trường phân lập.

- Tạo vùng thứ ba: Đào mặt que cấy rồi ria tạo vùng thứ ba, cách làm tương tự như ria tạo vùng thứ hai. Diện tích vùng thứ ba cũng chiếm khoảng 1/3 diện tích đĩa môi trường.

Thường ria cấy tạo thành 3 vùng là đủ. Cũng có thể tạo thêm vùng thứ tư. Tất nhiên để tạo 4 vùng thì diện tích mỗi vùng chỉ chiếm khoảng gần 1/4 diện tích đĩa môi trường.

**Lưu ý:** Các đường ria cấy càng xít nhau càng tận dụng được diện tích bề mặt môi trường để dàn mỏng mẫu xét nghiệm.

## 1.2. Cấy vi khuẩn lên môi trường thạch nghiêng

Môi trường đặc được đun nóng hoá lỏng, đổ vào ống nghiệm, giữ ống ở tư thế nghiêng thích hợp, chờ thạch đặc lại sẽ được ống thạch nghiêng. Thạch nghiêng có một mặt thoáng nghiêng hình bầu dục. Thạch nghiêng thường được sử dụng để kiểm tra độ thuần nhất của một mẫu vi khuẩn, nó thường có trong các bộ xác định tính chất sinh vật hoá học của vi khuẩn. Thạch nghiêng cũng thường được sử dụng để giữ chủng trong một thời gian ngắn. Ngoài ra, một số môi trường để xác định tính chất hoá sinh của vi khuẩn cũng được làm dưới dạng thạch nghiêng.

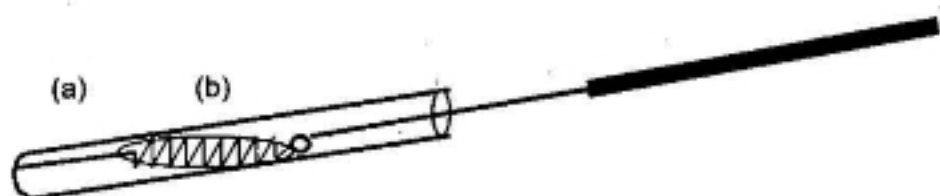
Kỹ thuật cấy trên thạch nghiêng được thực hiện theo trình tự sau:

- Dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn, nếu là huyền dịch thì lấy một quai cấy, nếu là khuẩn lạc thì chạm đầu que cấy lên mặt khuẩn lạc là đủ.
- Mở nút ống môi trường, khử trùng miệng ống, rồi đặt đầu que cấy đã lấy vi khuẩn vào chỗ thấp nhất của mặt thạch, ria đi ria lại nhiều lần, sau đó vừa ria vừa đưa dần que cấy lên cao đến hết mặt thạch (Hình 8.2).

- Khử khuẩn miệng ống rồi nút ống môi trường. Khử khuẩn que cấy đặt lên giá. Đặt ống môi trường đã ria cấy vào tủ ấm.



Hình 8.2. Ria cấy vi khuẩn lên mặt thạch nghiêng.



Hình 8.3. Cấy vi khuẩn vào ống thạch nghiêng, có cả phần đứng (a)

Đối với môi trường xác định tính chất sinh vật hoá học của vi khuẩn, ống môi trường có thể có cả phần đứng và phần nghiêng (Hình 8.3), đầu tiên vi khuẩn được cắm sâu vào phần đứng, sau đó kéo que cấy lên ria trên bề mặt phần nghiêng.

### 1.3. Cấy vào môi trường thạch sâu

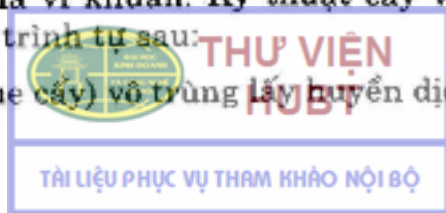
Mục này mô tả kỹ thuật cấy mẫu xét nghiệm vào thạch ống, chỉ có phần đứng, không có phần nghiêng. Thường để nuôi cấy vi khuẩn sinh nha bào và hiếu kỵ khí tùy ngộ. Trình tự thực hiện kỹ thuật này như sau:

- Đun nóng làm lỏng hoàn toàn môi trường, sau đó để nhiệt độ hạ xuống 50°C (môi trường vẫn còn ở trạng thái lỏng).
- Dùng pipet Pasteur vô trùng lấy khoảng 1 giọt huyền dịch vi khuẩn. Mở nút ống môi trường, khử khuẩn miệng ống rồi đưa đầu nhọn của pipet đã lấy vi khuẩn xuống tới đáy ống, sau đó vừa khuấy vừa từ từ rút pipet lên.
- Bỏ pipet vào bình đựng dung dịch sát khuẩn. Khử khuẩn miệng ống môi trường, nút ống rồi nhúng vào nước lạnh cho môi trường nhanh đặc lại, sau đó đặt vào tủ ấm.

## 2. CẤY VI KHUẨN VÀO MÔI TRƯỜNG LỎNG

Môi trường lỏng được dùng để tăng số lượng vi khuẩn hoặc xác định tính chất sinh vật hoá học của vi khuẩn. Kỹ thuật cấy vi khuẩn vào môi trường lỏng được thực hiện theo trình tự sau:

- Dùng pipet (hoặc que cấy) vô trùng lấy huyền dịch vi khuẩn.



- Mở nút ống môi trường, khử khuẩn miệng ống, rồi nhỏ một giọt huyền dịch vi khuẩn (hoặc khua đầu que cấy) vào ống môi trường.
- Bỏ pipet vào bình đựng dung dịch sát khuẩn (hoặc khử khuẩn que cấy đặt lên giá). Khử khuẩn miệng ống môi trường, nút ống, lắc cho vi khuẩn phân bố đều rồi đặt vào tủ ấm.

### 3. CẤY VI KHUẨN VÀO MÔI TRƯỜNG THẠCH MỀM

Thạch mềm là môi trường có tỷ lệ thạch thấp hơn môi trường đặc nhưng chưa ở trạng thái lỏng. Môi trường này thường dùng để xác định tính chất di động của vi khuẩn, đôi khi cũng được dùng để giữ chủng trong một thời gian ngắn. Kỹ thuật cấy vi khuẩn vào thạch mềm được thực hiện theo trình tự sau:

- Dùng que cấy thẳng (không có vòng ở đầu) vô trùng chấm vào vi khuẩn.
- Mở nút ống nghiệm, khử khuẩn miệng ống, rồi cắm đầu que cấy vào chính giữa, sâu xuống tới đáy ống, sau đó rút que cấy ra sao cho đường cấy càng gọn càng tốt.
- Khử khuẩn miệng ống, nút ống môi trường. Khử khuẩn que cấy đặt lên giá. Đặt ống môi trường vào tủ ấm.

### TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Hãy nêu mục đích và mô tả kỹ thuật cấy phân vùng trên môi trường phân lập?
2. Theo sự suy luận của bạn (dựa trên mục đích và sự mô tả kỹ thuật), kết quả cấy phân vùng như thế nào là đẹp, đạt và không đạt?
3. Hãy nêu mục đích và mô tả kỹ thuật cấy vi khuẩn vào môi trường thạch nghiêng, thạch sâu, thạch mềm và môi trường lỏng?



# PHA HUYỄN DỊCH VÀ CẤY ĐẾM VI KHUẨN

## MỤC TIÊU

1. Trình bày và thực hiện được qui trình pha huyền dịch vi khuẩn cho kỹ thuật kháng sinh đồ.
2. Trình bày và thực hiện được việc cấy đếm vi khuẩn.

Một số xét nghiệm vi sinh cần phải xác định số lượng vi khuẩn có trong bệnh phẩm hoặc trong huyền dịch vi khuẩn đã nuôi cấy. Muốn vậy, cần phải pha loãng bệnh phẩm hoặc huyền dịch thành nhiều nồng độ khác nhau. Sau khi pha loãng, huyền dịch có thể định lượng được bằng cách đo độ đục hoặc nuôi cấy đếm khuẩn lạc (cấy đếm). Độ đục có thể đo được bằng quang phổ kế (bước sóng 700nm) hoặc so sánh với độ đục chuẩn đã biết.

## 1. PHA HUYỄN DỊCH VI KHUẨN

Huyền dịch gốc có thể là canh thang nuôi cấy vi khuẩn (canh khuẩn) hoặc huyền dịch vi khuẩn sản xuất từ khuẩn lạc trên môi trường đặc hoặc có thể là bệnh phẩm, ví dụ dịch nhày ty hầu.

### 1.1. Pha loãng

Mỗi lần có thể pha loãng được 10 lần hoặc 100 lần; dung dịch dùng để pha loãng có thể là nước muối sinh lý (NaCl 0,9%) hoặc môi trường canh thang.

- Pha loãng 10 lần ( $10^{-1}$ ): lấy 0,5 ml huyền dịch gốc + 4,5 ml dung dịch pha loãng.
- Pha loãng 100 lần ( $10^{-2}$ ): lấy 0,1 ml huyền dịch gốc + 9,9 ml dung dịch pha loãng.

### 1.2. Pha huyền dịch vi khuẩn cho kháng sinh đồ

Để thực hiện kỹ thuật kháng sinh đồ, huyền dịch không được phép có quá nhiều hoặc quá ít vi khuẩn; vì số lượng vi khuẩn trong huyền dịch có ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả xét nghiệm - độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh. Huyền dịch một số vi khuẩn cần phải có mật độ  $10^8$  vi khuẩn/ml. Để đạt mục đích đó, ta tiến hành như sau:

- Nhặt vi khuẩn từ 5-10 khuẩn lạc hoà vào 1-2 ml dung dịch nước muối sinh lý (NMSL = NaCl 0,9%).
- Nghiền và lắc cho vi khuẩn được pha đều.
- So sánh với độ đục chuẩn McFarland 0,5. Độ đục này tương đương với huyền dịch có  $10^8$  vi khuẩn/ml (gọi là HD1). Nếu đặc hơn thì cho thêm NMSL, nếu loãng hơn thì nhạt thêm vi khuẩn.
- Muốn có huyền dịch  $10^6$  vi khuẩn/ml ta phải pha loãng bằng cách:
  - + Lấy 0,5 ml HD1 + 4,5 ml NMSL ta có HD2 ( $10^7$  vi khuẩn/ml)
  - + Lấy 0,5 ml HD2 + 4,5 ml NMSL ta có HD3 ( $10^6$  vi khuẩn/ml)
- Nếu muốn có nồng độ vi khuẩn thấp hơn cho những mục đích khác, ta phải pha loãng tiếp tục, ví dụ:
  - + Lấy 0,5 ml HD3 + 4,5 ml NMSL ta có HD4 ( $10^5$  vi khuẩn/ml)
  - + Lấy 0,5 ml HD4 + 4,5 ml NMSL ta có HD5 ( $10^4$  vi khuẩn/ml)
- Độ đục chuẩn McFarland 0,5 pha bằng cách:

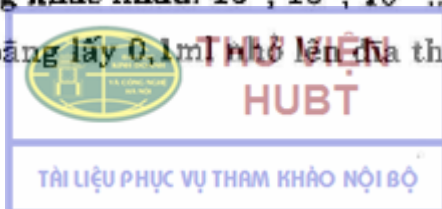
Lấy 0,6 ml dung dịch 1%  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  (10g/lít) cho vào ống đong (loại 100ml); sau đó đổ đầy 100ml bằng dung dịch 1%  $H_2SO_4$  (10ml  $H_2SO_4$  đặc/lít). Phân phối vào mỗi ống nghiệm (trong, sạch) khoảng 5ml; nên chọn những ống nghiệm có đường kính tương đương với các ống nghiệm sau này sẽ dùng để pha huyền dịch vi khuẩn. Ống nghiệm chứa độ đục chuẩn này được hàn kín. Nếu bảo quản ở nơi tránh ánh sáng, ống có độ đục chuẩn này có thể lưu trữ được trong 6 tháng.

## 2. CẤY ĐẾM

Cấy đếm là phương pháp nuôi cấy nhằm xác định số lượng vi khuẩn có khả năng sinh sản (đơn vị tạo khuẩn lạc- colony forming units – cfu) trong một bệnh phẩm hoặc một canh khuẩn/môi trường lỏng đã có vi khuẩn phát triển. Trong nghiên cứu, cấy đếm được áp dụng để xác định ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy (ví dụ thành phần của môi trường) tới sự phát triển của vi khuẩn; muốn vậy người ta phải xác định số lượng vi khuẩn sau những thời gian nuôi cấy nhất định. Ngoài ra, cấy đếm còn được áp dụng để tìm ra tác nhân gây nhiễm khuẩn đường hô hấp, do nhiều vi khuẩn có khả năng gây bệnh cơ hội cùng tồn tại trong bệnh phẩm.

Nguyên tắc cấy đếm:

- Trước hết phải pha canh khuẩn hoặc bệnh phẩm thành những huyền dịch có độ pha loãng khác nhau:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ...
- Mỗi nồng độ pha loãng lấy 0,1ml nhỏ lên đĩa thạch; mỗi nồng độ nên cấy 2 đĩa.



- Dùng que thủy tinh (đã uốn cong thành hình tam giác và được tiệt trùng) dần đều.
- Ủ ấm qua đêm.
- Đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch; lấy trung bình; và tính trung bình từ ít nhất là 2 nồng độ pha loãng, ta sẽ có được số lượng vi khuẩn có trong canh khuẩn (bệnh phẩm). Chỉ nên lấy kết quả ở nồng độ pha loãng tạo được  $\geq 10$  đến khoảng 500 khuẩn lạc trên một đĩa thạch để tính toán; nếu sử dụng số liệu  $< 10$  hoặc  $> 500$  khuẩn lạc/ đĩa sẽ cho sai số lớn hơn.

Ví dụ: Một canh khuẩn được nuôi cấy ở điều kiện nhất định, sau 16 giờ.

Tại nồng độ pha loãng  $10^{-2}$ : Đĩa thứ nhất có 98 khuẩn lạc; đĩa thứ hai có 102 khuẩn lạc; trung bình là 100.

Tại nồng độ pha loãng  $10^{-3}$ : Đĩa thứ nhất có 15 khuẩn lạc; đĩa thứ hai có 13 khuẩn lạc; trung bình là 14.

Số lượng vi khuẩn trong 1 ml canh khuẩn đó sẽ là:

$$(100 \times 10^2 \times 10 + 14 \times 10^3 \times 10) : 2 = 1,2 \times 10^6$$

## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Pha huyền dịch vi khuẩn nhằm mục đích gì?
2. Bằng cách nào có thể xác định được mật độ (số lượng vi khuẩn trong đơn vị thể tích) của một huyền dịch vi khuẩn?
3. Tại sao khi cấy đếm vi khuẩn lại cần hai đĩa thạch cho mỗi độ pha loãng?
4. Tại sao khi cấy đếm chỉ đọc kết quả ở những đĩa thạch tạo được từ 10 đến 500 khuẩn lạc?
5. Liệt kê tất cả những sai sót có thể làm sai lệch kết quả xác định mật độ vi khuẩn trong một huyền dịch. Giải thích rõ mỗi sai sót đó ảnh hưởng như thế nào.





# LẤY, XỬ LÝ VÀ BẢO QUẢN HUYẾT THANH

## MỤC TIÊU

1. Trình bày được cách lấy và xử lý máu tĩnh mạch để có huyết thanh đạt tiêu chuẩn.
2. Thực hiện đúng qui trình lấy và xử lý huyết thanh.
3. Trình bày được cách bảo quản huyết thanh.

Nếu để máu đông tự nhiên thì huyết thanh là phần dịch tiết ra khi máu đã hình thành cục đông và co lại.

Huyết thanh người dùng để làm các phản ứng huyết thanh học trong chẩn đoán bệnh, sản xuất globulin miễn dịch và trong các nghiên cứu khoa học khác.

Một mẫu huyết thanh tốt là mẫu vô trùng, trong suốt, không đông và không có hemoglobin (không vỡ hồng cầu).

## I. CÁCH LẤY VÀ XỬ LÝ MÁU

- Bệnh nhân nhịn ăn trước khi lấy máu.
- Lấy máu tĩnh mạch một cách vô trùng (theo đúng kỹ thuật trong *Điều dưỡng học*), cho vào ống nghiệm khô, vô trùng. Khi bơm máu vào ống, phải bơm từ từ vào thành ống để tránh vỡ hồng cầu. Có thể để ống máu nghiêng vì như vậy sẽ tạo điều kiện tiết huyết thanh tốt hơn.
- Để máu đông tự nhiên.
- Khi máu đã co thành cục thì dùng một que thủy tinh nhỏ tách chân cục máu ra khỏi thành ống. Động tác này phải làm nhẹ nhàng để tránh vỡ hồng cầu.
- Ly tâm (2000 vòng/phút trong 5 phút).
- Hút lấy dịch trong suốt ở phía trên, cho vào ống nghiệm mới, khô và vô trùng.

**Chú ý:** để chất được huyết thanh tốt, dùng pipet Pasteur, hút nhẹ, không làm vẩn từ dưới lên. Huyết thanh phải trong suốt, màu vàng chanh

(nếu thấy có màu đỏ là máu đã bị vỡ hồng cầu), không lẫn tế bào máu (nếu thấy đục là còn lẫn tế bào máu). Trên thực tế, để đảm bảo cho các mẫu huyết thanh đủ chất lượng, người ta thường phải ly tâm và chất lại một lần nữa.

## 2. CÁCH BẢO QUẢN

Nếu huyết thanh được dùng ngay trong vòng 3 ngày thì giữ ở nhiệt độ 4°C; nếu dùng trong vòng 1 tuần thì giữ trong ngăn đá tủ lạnh, nếu lâu hơn thì phải giữ ở nhiệt độ lạnh sâu (âm 20°C trở xuống; càng lạnh sâu, huyết thanh càng giữ được lâu hơn).

## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày cách lấy, xử lý máu và chất huyết thanh?
2. Nêu các tính chất của một mẫu huyết thanh đã được lấy đúng kỹ thuật?
3. Trình bày cách bảo quản huyết thanh?

## LẤY MÁU THỎ

### MỤC TIÊU

1. Nêu được các điều kiện về thỏ, phòng lấy máu và trang bị cho người lấy máu thỏ.
2. Trình bày được qui trình lấy máu từ tim thỏ và bảo quản máu thỏ.
3. Thực hiện được việc lấy máu từ tim thỏ.

Máu thỏ thường được dùng để bổ sung vào các môi trường nuôi cấy vi khuẩn nhằm làm tăng các chất dinh dưỡng cần thiết và để tăng khả năng phát hiện một số đặc tính của vi khuẩn (tan máu, biến đổi máu). Có thể sử dụng máu thỏ toàn phần (dùng làm thạch máu, thạch chocolate) hoặc huyết thanh (môi trường nuôi cấy leptospira) hoặc huyết tương (phản ứng coagulase).

Kỹ thuật xử lý và bảo quản máu thỏ và các sản phẩm của nó (huyết tương, huyết thanh) cũng tương tự như cách làm đối với máu người. Nguyên tắc cơ bản của kỹ thuật lấy máu thỏ là phải đảm bảo cho máu vô trùng.

Nếu cần ít máu thì lấy máu ở tĩnh mạch tai thỏ, nếu cần nhiều thì phải lấy máu ở tim. Bài này chỉ trình bày kỹ thuật lấy máu tim thỏ.

### 1. CHỌN THỎ

- Chọn những con thỏ khỏe mạnh, nặng > 2 kg, đang được nuôi dưỡng tốt. Nếu thỏ nuôi để lấy máu nhiều lần thì mỗi con chỉ lấy máu 1 lần/tuần để đảm bảo chất lượng của máu và sức khỏe của thỏ.
- Những con thỏ có biểu hiện bệnh lý như kém ăn, yếu ớt, nhiễm trùng da (loét, mụn, ghẻ ...) thì không được dùng để lấy máu.

### 2. PHÒNG LẤY MÁU

- Phòng lấy máu phải tách biệt khỏi nơi nuôi thỏ và được thiết kế như một phòng vô trùng.
- Phải được trang bị bàn lấy máu chuyên dùng.



- Phải làm vệ sinh thường xuyên, bao gồm lau sàn nhà bằng thuốc sát trùng, lau bụi trên tường; mặt bàn đá, mặt bàn lấy máu phải được lau kỹ bằng xà phòng và thuốc sát trùng trước khi tiến hành lấy máu.

### 3. NGƯỜI LẤY MÁU

- Mặc quần áo riêng (vô trùng) của buồng lấy máu.
- Đeo khẩu trang, mũ.
- Đeo găng tay vô trùng.

### 4. KỸ THUẬT LẤY MÁU

Thực hiện lần lượt các bước sau đây:

- Bắt thỏ từ chuồng nuôi vào phòng trước của buồng lấy máu (buồng lấy máu được ngăn thành hai phòng, phòng trước và phòng sau).
- Mặc quần áo vô trùng.
- Mang thỏ vào phòng sau.
- Buộc thỏ lên bàn lấy máu chuyên dụng.
- Cắt lông thỏ vùng trước tim.
- Sát trùng vùng da vừa cắt lông và vùng lông xung quanh.
- Đeo găng tay vô trùng.
- Phủ khăn vô trùng trùm lên toàn bộ thỏ (khăn đã có lỗ thủng trước vùng tim).
- Sát trùng lại vùng da lộ ra.
- Chuẩn bị bơm tiêm: lấy bơm tiêm vô trùng, dung tích 10 ml, lắp kim. Nếu cần máu toàn phần thì lấy 1ml chất chống đông (natri citrate 3,8%).
- Dùng ngón trỏ (bàn tay trái) tìm mỏm tim (nơi có tiếng đập rõ nhất dưới ngón tay), tay phải dùng bơm tiêm chọc thẳng và dứt khoát mũi kim vào buồng tim rồi kéo pitông để hút máu vào bơm tiêm. Nếu chọc không dứt khoát và không đủ độ sâu, đầu mũi kim nằm trong cơ tim thì cơ tim có thể bị xé rách (do tim đang co bóp) nên thỏ dễ bị chết trước khi lấy được máu.
- Khi đã đủ 10 ml máu thì rút kim ra, kéo pitông xuống thêm một đoạn rồi lắc lên, lắc xuống vài lần để trộn đều chất chống đông (chú ý, lắc nhẹ nhàng để tránh vỡ hồng cầu). Sau đó, bơm máu vào ống nghiệm vô trùng (có thể tráng chất chống đông trước). Khi bơm, phải bơm từ từ vào thành ống để tránh vỡ hồng cầu. Lắc nhẹ ống máu (hoặc xoa trong lòng hai bàn tay) để tránh đông máu.

- Sát trùng vùng da vừa dùng.

## 5. BẢO QUẢN MÁU

Máu lấy xong, nếu chưa dùng ngay, phải bảo quản trong tủ lạnh ( $4-8^{\circ}\text{C}$ ), không được để trong ngăn đá. Máu bảo quản trong tủ lạnh có thể dùng được trong vòng 1 tuần.

## 6. XỬ LÝ THỎ SAU KHI LẤY MÁU

Nếu thỏ cần phải giữ lại để lấy máu nhiều lần thì sau mỗi lần lấy máu, tiêm 10 ml glucose 10% (vô trùng) vào tĩnh mạch vành tai hoặc tiêm vào cơ đùi thỏ để thỏ hồi phục nhanh hơn. Sau khi tiêm, để thỏ nằm nghỉ 15 phút trên bàn; sau đó tháo dây buộc, mang thỏ nhẹ nhàng và cẩn thận trả lại chuồng nuôi.

## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Nêu những điều kiện cụ thể về thỏ, phòng lấy máu và trang bị của người lấy máu thỏ?
2. Mô tả qui trình lấy máu từ tim thỏ và cách bảo quản máu thỏ?



THƯ VIỆN  
HUBT

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

# TIÊM TRUYỀN SÚC VẬT THÍ NGHIỆM

## MỤC TIÊU

1. Nêu được mục đích của việc tiêm truyền súc vật thí nghiệm.
2. Mô tả được cách tiêm truyền súc vật thí nghiệm theo các đường thông dụng trong xét nghiệm vi sinh.
3. Thực hiện đúng việc tiêm truyền cho súc vật thí nghiệm theo một số đường thường được áp dụng.

Tiêm truyền súc vật thí nghiệm nhằm mục đích xác định khả năng gây bệnh hoặc tìm độc lực của vi sinh vật. Đôi khi người ta còn dùng động vật thích hợp để phân lập vi khuẩn từ những bệnh phẩm bội nhiễm (phế cầu, chuột nhắt trắng, leptospira-chuột lang). Trong sản xuất các chế phẩm sinh học (vaccin, huyết thanh miễn dịch), người ta cũng thường xuyên phải tiêm truyền súc vật.

Rất nhiều súc vật thí nghiệm được sử dụng trong vi sinh vật học nhưng thông thường nhất là thỏ, chuột nhắt trắng và chuột lang; ngoài ra, tùy theo mục đích sử dụng, người ta có thể dùng ngựa, cừu hoặc dê. Các đường tiêm cho súc vật thí nghiệm là đường trong da, dưới da, bắp thịt, tĩnh mạch, ổ bụng hoặc não.

Bài này mô tả tóm tắt các kỹ thuật tiêm truyền trên thỏ, chuột nhắt trắng và chuột lang.

## 1. TIÊM TRONG DA

Tiêm trong da nhằm mục đích phát hiện các phản ứng của động vật với chất tiêm vào (vi khuẩn, sản phẩm chuyển hoá hoặc độc tố của nó).

Kỹ thuật tiêm: giống như tiêm "Mantoux" ở người.

Sát trùng vùng tiêm. Dùng bơm tiêm 1 ml, kim nhỏ và ngắn, tiêm khoảng 0,1 ml vào trong da; nếu thấy phồng lên bằng hạt đậu xanh là được, nếu không thấy phồng là đã tiêm vào dưới da. Sau khi rút kim ra, sát trùng lại vùng da.



THƯ VIỆN  
HUBT

## 2. TIÊM DƯỚI DA

Sát trùng da. Dùng ngón trỏ và ngón cái bàn tay trái kéo da lên, tay phải cầm bơm tiêm để tiêm bệnh phẩm. Sát trùng lại sau khi tiêm.

## 3. TIÊM BẮP THỊT

Thường tiêm vào đùi sau. Kỹ thuật tiêm giống như tiêm bắp ở người.

## 4. TIÊM TÍNH MẠCH

Thường áp dụng đối với thỏ, rất khó đối với chuột lang.

### *Kỹ thuật tiêm:*

Nơi tiêm tốt nhất và thuận lợi nhất là tĩnh mạch vành tai thỏ (tĩnh mạch vành tai ít di động hơn những tĩnh mạch khác).

Cố định thỏ vào bàn chuyên dụng (như trong phần lấy máu thỏ). Làm cho tĩnh mạch dãn ra bằng cách búng nhẹ hoặc dùng aceton bôi vào tai thỏ. Dùng tay trái nâng tai thỏ lên vị trí thuận lợi để nhìn rõ tĩnh mạch vành tai. Tay phải cầm bơm tiêm, chọc kim vào tĩnh mạch rồi tiêm từ từ. Nếu kim đã nằm trong tĩnh mạch thì khi tiêm, tĩnh mạch trắng ra do chất tiêm vào đã đẩy máu chảy đi; nếu thấy tĩnh mạch vẫn đỏ thì nghĩa là kim chưa vào đúng lòng tĩnh mạch. Khi tiêm xong, phải sát trùng cẩn thận vùng vừa tiêm. Nếu máu vẫn chảy ra thì bịt một ít lông đắp vào, máu sẽ cầm nhanh hơn.

## 5. TIÊM Ổ BỤNG

Thường được áp dụng đối với chuột lang và chuột nhắt trắng.

### *Kỹ thuật tiêm:*

*Đối với chuột lang:* Cầm hai chân sau, uốn cong chuột về phía trước để dẫn ruột về phía cơ hoành. Sát trùng nơi tiêm, dùng hai ngón tay kéo da bụng lên và cầm thẳng kim tiêm vào ổ bụng. Kiểm tra vị trí của đầu kim bằng cách xoay từ từ bơm tiêm xem có thấy tổ chức nào di động theo hay không. Nếu thấy có tổ chức di động theo đầu kim tiêm thì phải rút bớt đầu kim lên cho đến khi nào thấy nó di động độc lập. Khi chắc chắn là đầu kim không nằm trong tạng nào thì bơm bệnh phẩm vào.

*Đối với chuột nhắt trắng:* Dùng tay phải cầm đuôi để cho chuột bò trên một giá đỡ. Tay trái túm lấy gáy chuột, lật ngửa chuột lên, kẹp đuôi vào kẽ các ngón tay làm sao cho bụng chuột được bộc lộ căng ra. Tiêm làm hai thì:

Thì 1: Chọc kim qua da ở tư thế ngang;

Thì 2: Dụng đúng bơm tiêm và tiêm qua màng bụng. Nếu thấy chỗ tiêm không phồng lên là được.



## 6. TIÊM VÀO NÃO

Thường áp dụng đối với chuột nhắt trắng và chuột ỏ.

Đối với chuột nhắt trắng, gây mê bằng ether. Sát trùng sọ. Dùng bơm tiêm nhỏ, chọc kim qua xương sọ vào thẳng trong não rồi tiêm từ từ. Tiêm xong phải sát trùng lại.

## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể các mục đích tiêm truyền sức vật thí nghiệm trong phòng xét nghiệm vi sinh?
2. Liệt kê các đường gây bệnh thực nghiệm trên sức vật?
3. Trình bày cách tiêm vi sinh vật hoặc bệnh phẩm vào sức vật thí nghiệm theo các đường trong da, dưới da, bắp thịt, tĩnh mạch và não?



THƯ VIỆN  
HUBT

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ



# NHỮNG KHÁI NIỆM CƠ BẢN VỀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM VI SINH

## MỤC TIÊU

1. Trình bày được định nghĩa chất lượng xét nghiệm (XN) vi sinh.
2. Phân tích được những yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng XN vi sinh.
3. Trình bày được các bước trong qui trình XN vi sinh.
4. Phân tích được những tiêu chuẩn cơ bản của chất lượng XN vi sinh.
5. Trình bày được khái niệm về hai loại kiểm tra chất lượng.

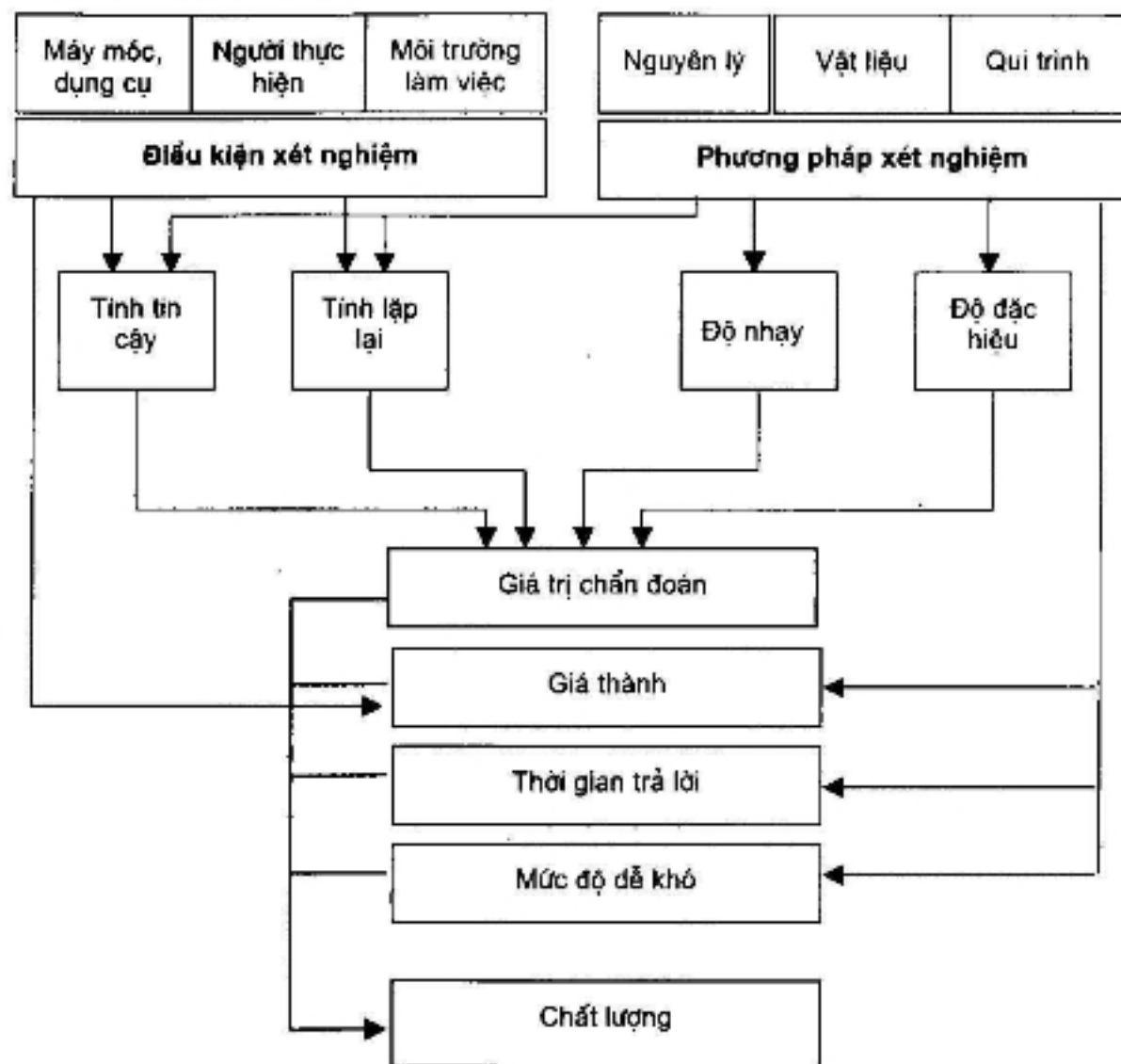
## 1. ĐỊNH NGHĨA CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM VI SINH

Chất lượng xét nghiệm vi sinh y học bao gồm sự hoàn thiện về kỹ thuật (tính chính xác và tính lặp lại) và giá trị phục vụ cho công tác phòng bệnh, chữa bệnh, nghiên cứu khoa học (tính xác đáng, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá thành, mức độ dễ khó và thời gian trả lời kết quả).

- Tính tin cậy/tính chính xác (reliability/accuracy): là mức độ gần nhau giữa kết quả xét nghiệm thu được và giá trị đích thực (có thể so sánh như mức độ gần tâm bia khi bắn súng – giá trị đích thực là điểm 10).
- Tính lặp lại (reproducibility): cho thấy mức độ gần nhau của các kết quả khi xét nghiệm được làm lại nhiều lần (có thể so sánh như mức độ chụm khi bắn súng). Tính lặp lại có thể cao trong khi tính chính xác lại thấp (như bắn chụm nhưng điểm thấp).
- Độ nhạy (sensitivity): Độ nhạy của một phương pháp là tỷ lệ (%) cho kết quả dương tính khi xét nghiệm các mẫu dương bằng phương pháp đó.
- Độ đặc hiệu (specificity): Độ đặc hiệu của một phương pháp là tỷ lệ (%) cho kết quả âm tính khi xét nghiệm các mẫu âm bằng phương pháp đó.
- Giá thành: Giá chi trả cho xét nghiệm và tỷ lệ chi phí trên lợi ích thực tế mà xét nghiệm mang lại.
- Mức độ dễ khó: Kỹ thuật đơn giản hay phức tạp, thực hiện dễ hay khó.
- Thời gian tính: Xét nghiệm cho kết quả nhanh hay chậm.

## 2. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM

Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng xét nghiệm vi sinh, có thể chia thành 2 nhóm: nhóm thứ nhất gồm những yếu tố thuộc về bản chất của phương pháp xét nghiệm, nhóm thứ hai gồm các điều kiện cụ thể trong đó xét nghiệm được thực hiện (Hình 13.1).

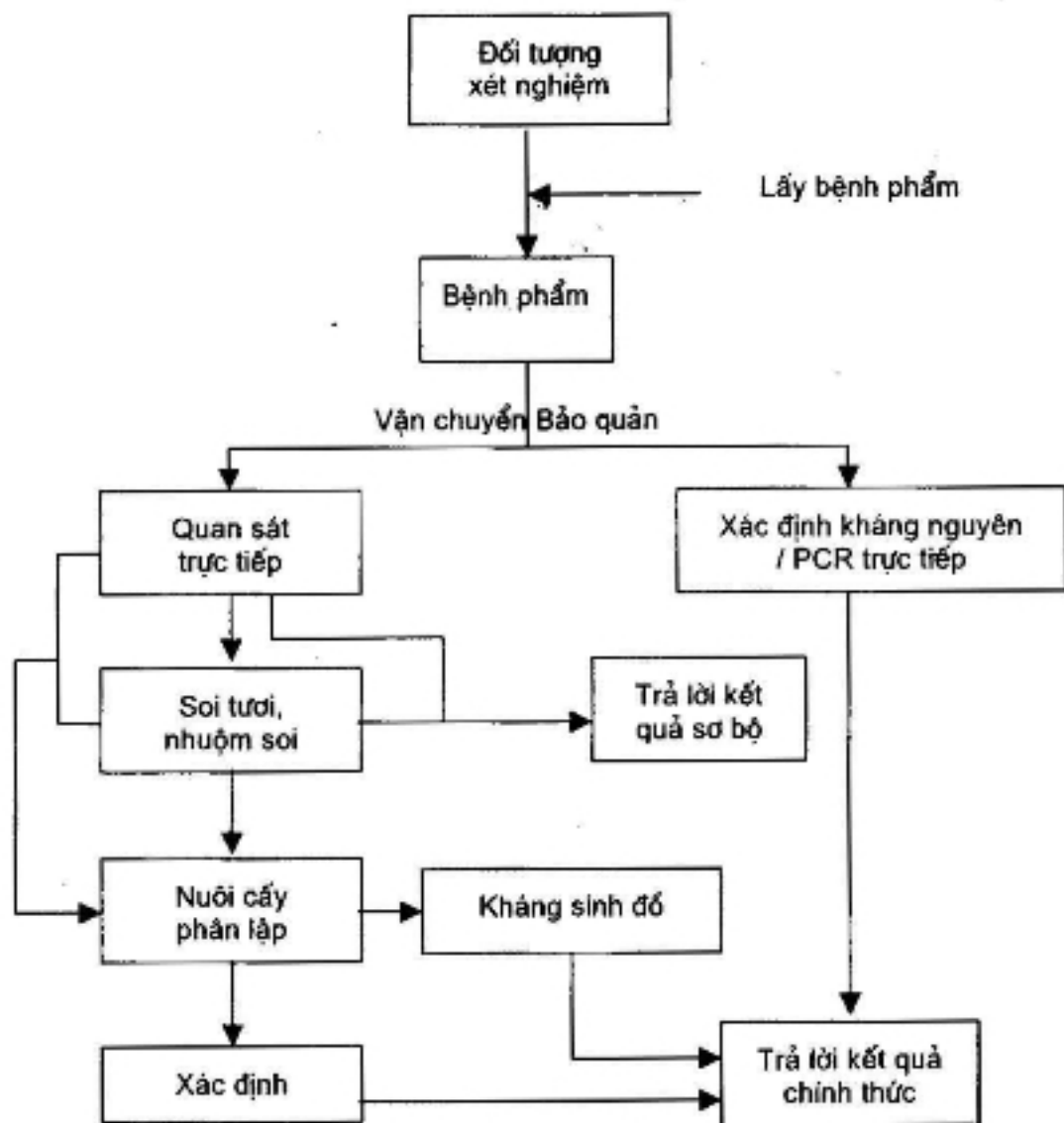


Hình 13.1. Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng xét nghiệm

## 3. QUI TRÌNH XÉT NGHIỆM VI SINH

### 3.1. Quy trình chẩn đoán trực tiếp

Chẩn đoán trực tiếp là phương pháp chẩn đoán bệnh nhiễm trùng bằng cách xác định trực tiếp sự có mặt của vi sinh vật hay sản phẩm của nó trong bệnh phẩm. Sơ đồ dưới đây (Hình 13.2) giới thiệu khái quát quy trình chẩn đoán trực tiếp thường được sử dụng trong các phòng xét nghiệm vi sinh.

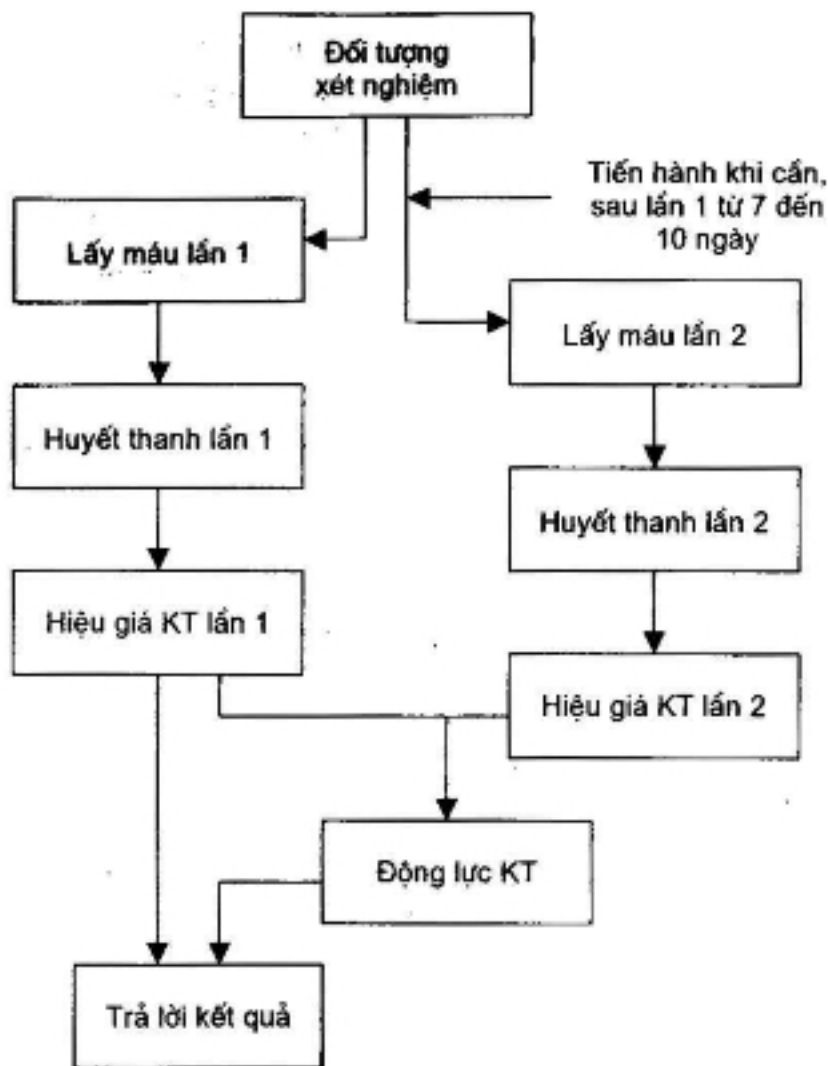


Hình 13.2. Quy trình chẩn đoán trực tiếp

### 3.2. Quy trình chẩn đoán gián tiếp

Chẩn đoán gián tiếp là phương pháp chẩn đoán bệnh nhiễm trùng bằng cách xác định sự có mặt của kháng thể đặc hiệu chống lại vi sinh vật trong dịch sinh học lấy từ bệnh nhân, thường là huyết thanh, vì vậy còn gọi là chẩn đoán huyết thanh học. Dựa vào kết quả xét nghiệm kháng thể - là sản phẩm của cơ thể - ta "gián tiếp" xác định có quá trình nhiễm trùng đã hoặc đang diễn ra. Sơ đồ dưới đây (Hình 13.3) giới thiệu khái quát quy trình xác định kháng thể trong huyết thanh.





Hình 13.3. Quy trình chẩn đoán gián tiếp

## 4. CÁC TIÊU CHUẨN CỦA CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM VI SINH

### 4.1. Tính xác đáng

Một xét nghiệm vi sinh có tính xác đáng phải nhằm đáp ứng mục tiêu phục vụ cho chẩn đoán, chữa bệnh và phòng bệnh nhiễm trùng. Đây là tiêu chuẩn phải được xem xét đầu tiên. Để đạt được tiêu chuẩn này, người làm trong phòng xét nghiệm phải có thông tin đầy đủ từ phía các thầy thuốc lâm sàng hoặc từ các cán bộ công tác ở cộng đồng.

Dưới đây là một số ví dụ minh họa cho tính sát hợp lâm sàng (clinical relevance).

- Khi phân lập được *Streptococcus pyogenes*, việc làm kháng sinh đồ là không sát hợp lâm sàng, bởi vì trên *in vitro* benzylpenicillin là kháng sinh luôn luôn có hiệu lực tốt với vi khuẩn này.

- Việc xác định typ huyết thanh của các chủng *Escherichia coli* phân lập từ các trường hợp tiêu chảy tản phát là không sát hợp lắm sàng, bởi vì không có mối liên quan rõ ràng giữa typ huyết thanh và khả năng gây bệnh.
- Khi cấy đếm nước tiểu giữa dòng cho kết quả  $\leq 10^3$  vi khuẩn trong 1ml, việc định danh vi khuẩn và làm kháng sinh đồ là không xác đáng, bởi vì trường hợp đó không bị nhiễm khuẩn đường tiết niệu.

#### 4.2. Tính tin cậy (độ đúng)

Tính tin cậy cho thấy mức tương quan giữa giá trị xét nghiệm được và giá trị đích thực của đối tượng cần xác định. Với xét nghiệm định lượng một chất nào đó, tính tin cậy được đo bằng mức độ gần giữa kết quả thu được với nồng độ đích thực của chất đó trong mẫu xét nghiệm.

Dưới đây là một số ví dụ về các xét nghiệm loại này.

- Xác định sự phân bố về tỷ lệ các loại căn nguyên gây ra một bệnh nhiễm trùng.
- Xác định hiệu giá kháng thể trong huyết thanh bệnh nhân.
- Xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn bằng phương pháp khoan giấy khuếch tán hoặc bằng phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC).

Có hai điều thiết yếu cần phải quan tâm khi xem xét tính tin cậy. Thứ nhất, phải thống nhất về mặt thuật ngữ và phải sử dụng danh pháp quốc tế. Thứ hai, phương pháp được sử dụng phải đồng nhất. Không có hai điều này sẽ không thể có tiếng nói chung. Tính tin cậy được so sánh với kết quả bán bia, càng gần tâm bia (điểm 10) tính tin cậy càng cao (Hình 13.4).

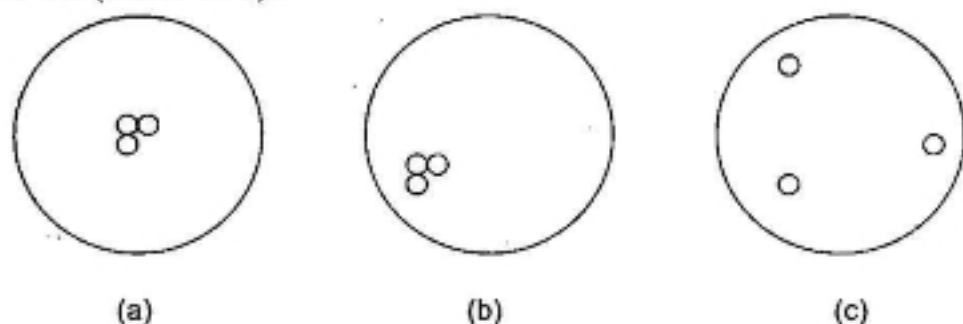
#### 4.3. Tính lặp lại

Tính lặp lại được xác định bằng cách làm lại xét nghiệm nhiều lần bằng cùng một qui trình kỹ thuật. Tính lặp lại sẽ cao khi có sự đồng nhất về mẫu xét nghiệm (bệnh phẩm), dụng cụ vật liệu xét nghiệm, điều kiện môi trường và kỹ năng của người thực hiện.

Hai nguyên nhân thường gặp trong chẩn đoán trực tiếp có thể làm giảm tính lặp lại là:

- Với cùng một loại bệnh phẩm lấy từ cùng một bệnh nhân nhưng nuôi cấy phân lập lại có thể cho kết quả khác nhau vì trong bệnh phẩm đó có thể có một số loại căn nguyên khác nhau.
- Trong thời gian bảo quản bệnh phẩm, tốc độ chết của các loại vi sinh vật khác nhau vì vậy nuôi cấy phân lập lại sau một thời gian có thể cho kết quả khác nhau (về loại vi sinh vật phân lập được hoặc mật độ của chúng).

Cần phải lưu ý rằng, những sai sót hệ thống có thể làm cho kết quả sai lệch đi rất nhiều (không còn đảm bảo tính tin cậy), nhưng tính lặp lại vẫn có thể rất cao, thậm chí vẫn có thể đạt được đến mức tuyệt đối. Ví dụ: Khi xác định độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh bằng phương pháp khoan giấy khuếch tán. Khi khoan giấy kháng sinh bị giảm hoạt lực, làm lại nhiều lần đường kính vùng ức chế vẫn giống nhau (tính lặp lại cao), nhưng nhỏ hơn giá trị đích thực (tính tin cậy thấp). Tính lặp lại được so sánh với “độ chụm” khi bắn bia (Hình 13.4).



**Hình 13.4.** Tính tin cậy và tính lặp lại được so sánh với điểm đạt được và “độ chụm” trong bắn bia: (a) tính tin cậy và tính lặp lại đều cao, (b) tính lặp lại cao, tính tin cậy thấp, (c) tính tin cậy và tính lặp lại đều thấp

#### 4.4. Độ nhạy

Độ nhạy cho thấy khả năng phát hiện đối tượng xét nghiệm – Độ nhạy của một phương pháp tỷ lệ nghịch với mật độ/nồng độ tối thiểu của đối tượng cần tìm mà phương pháp đó còn phát hiện được. Độ nhạy của một phương pháp được tính bằng tỷ lệ phần trăm cho kết quả dương tính khi xét nghiệm bằng phương pháp đó đối với lượng đủ lớn những mẫu đã được xác định chắc chắn dương tính.

Độ nhạy càng cao thì càng ít trường hợp âm tính giả. Nếu độ nhạy là 100% thì sẽ không có âm tính giả. Tuy nhiên dương tính giả vẫn có thể gặp ở các phương pháp xét nghiệm với bất kỳ độ nhạy nào, nếu độ đặc hiệu không phải là 100%.

Phương pháp có độ nhạy cao thường được sử dụng trong các điều tra nghiên cứu sàng lọc, nhằm hạn chế tới mức thấp nhất âm tính giả nhưng chấp nhận dương tính giả (nhằm còn hơn bỏ sót). Sau đó những trường hợp dương tính giả sẽ được loại trừ bằng phương pháp có độ đặc hiệu cao.

**Công thức tính độ nhạy và độ đặc hiệu:**

Kết quả	Mẫu dương	Mẫu âm
Dương tính	a	b
Âm tính	d	d
Cộng	a + d	b + d

$$N(\%) = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$Đ(\%) = \frac{d}{b + d} \times 100$$

N = Độ nhạy

Đ = Độ đặc hiệu

a = (+) tính thật

b = (+) tính giả

c = (-) tính giả

d = (-) tính thật

#### 4.5. Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của một phương pháp là khả năng đúng về mặt định tính đối tượng xét nghiệm. Độ đặc hiệu của một phương pháp được tính bằng tỷ lệ phần trăm cho kết quả âm tính khi xét nghiệm bằng phương pháp đó đối với lượng đủ lớn những mẫu đã được xác định chắc chắn âm.

Độ đặc hiệu càng cao thì càng ít trường hợp dương tính giả. Nếu độ đặc hiệu là 100% thì sẽ không có dương tính giả. Tuy nhiên âm tính giả vẫn có thể gặp ở các phương pháp xét nghiệm với bất kỳ độ đặc hiệu nào, nếu độ nhạy không phải là 100%.

Người ta thường chọn phương pháp có độ đặc hiệu cao để kiểm tra lại những mẫu thu thập được từ các điều tra nghiên cứu sàng lọc để loại trừ những mẫu dương tính giả.

Cần lưu ý rằng, cùng một phương pháp kỹ thuật khi được sử dụng để xét nghiệm các loại bệnh phẩm khác nhau sẽ có độ đặc hiệu khác nhau. Ví dụ: Phương pháp nhuộm Ziehl-Neelsen có độ đặc hiệu cao khi nhuộm đờm tìm vi khuẩn lao để chẩn đoán lao phổi, vì chỉ có ít trường hợp cho kết quả dương tính giả. Ngược lại, nếu phương pháp này được sử dụng nhuộm cặn nước tiểu để chẩn đoán lao đường tiết niệu thì có tính đặc hiệu thấp, bởi vì có rất nhiều trường hợp dương tính giả do các chủng *Mycobacterium* không điển hình (*Atypical mycobacteria*).

## 5. HAI LOẠI KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

### 5.1. Nội kiểm (Internal quality control)

Nội kiểm là chương trình tự kiểm tra của chính cơ sở xét nghiệm. Trước hết nó khẳng định bản thân phòng xét nghiệm mong muốn hoạt động với chất lượng tốt. Thứ hai, việc tự kiểm tra thường xuyên có tầm quan trọng đặc biệt trong duy trì và nâng cao chất lượng xét nghiệm.



THƯ VIỆN  
HUBT

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

### 5.1.1. Nguyên tắc chung

Nội kiểm phải có tính thực tiễn, có tính kinh tế và có khả năng thực thi.

Một chương trình nội kiểm không thể đánh giá mọi qui trình, trang bị, vật liệu phục vụ cho xét nghiệm hàng ngày. Phải chọn lựa ưu tiên đánh giá một số qui trình, môi trường, thuốc thử... căn cứ vào kế hoạch làm việc và tầm quan trọng của mỗi vấn đề đối với chất lượng của xét nghiệm.

### 5.1.2. Nội dung nội kiểm

Nội kiểm bao gồm 8 mục; các mục này được phân tích kỹ trong bài "Đảm bảo chất lượng xét nghiệm: giám sát chất lượng - nội kiểm".

- (1) Kiểm tra thường qui làm việc
- (2) Kiểm tra việc bảo quản và sử dụng trang thiết bị
- (3) Kiểm tra môi trường nuôi cấy.
- (4) Kiểm tra thuốc thử, thuốc nhuộm.
- (5) Kiểm tra kháng nguyên và kháng huyết thanh.
- (6) Kiểm tra vật liệu làm kháng sinh đồ.
- (7) Lưu giữ chủng.
- (8) Chủng mẫu.

### 5.2. Ngoại kiểm (External quality assessment)

Ngoại kiểm (đánh giá chất lượng từ bên ngoài) là sự đánh giá khách quan của các tổ chức khác – "bên ngoài" phòng xét nghiệm. Ngoại kiểm nhằm các mục đích sau:

- Đảm bảo với các thầy thuốc lâm sàng và cộng đồng về chất lượng của các kết quả xét nghiệm.
- Đánh giá và so sánh tính tin cậy của kết quả xét nghiệm trên chuẩn mực quốc gia (hay quốc tế).
- Phát hiện ra các sai sót thường mắc phải.
- Khuyến khích việc sử dụng các qui trình thống nhất.
- Khuyến khích việc sử dụng các môi trường, hoá chất, sinh phẩm đạt tiêu chuẩn quốc gia hay quốc tế.
- Khích lệ việc thực hiện chương trình kiểm tra chất lượng từ bên trong.
- Đánh giá các labo khi cần xem xét cấp giấy chứng nhận hành nghề.

Chương trình ngoại kiểm bao gồm những bước điều tra bằng cách gửi các mẫu xét nghiệm được mã hoá đến các labo tham gia chương trình, yêu cầu xét



nghiệm theo thường qui đang sử dụng và trả lời kết quả trong một khoảng thời gian nhất định.

Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế Thế giới, những cuộc điều tra trong chương trình ngoại kiểm nên đạt được các điểm sau:

- Tối thiểu tiến hành 4 lần trong 1 năm, tốt nhất là mỗi tháng 1 lần.
- Mỗi lần gửi tối thiểu 3 mẫu cần xét nghiệm.
- Khoảng thời gian nộp báo cáo cần phải đủ ngắn, khoảng 1 tuần kể từ khi nhận được mẫu xét nghiệm.
- Mỗi lần điều tra đều phải gửi kèm lời chỉ dẫn và mẫu báo cáo (2 bản – một bản gửi đi, một bản lưu giữ tại phòng xét nghiệm).

Ngay sau khi nhận được tất cả các báo cáo (hoặc sau thời hạn cuối cùng nhận báo cáo), phải gửi đáp án và sự phân bố điểm cho tất cả các labo tham gia điều tra. Trong khoảng 1 tháng tiếp theo phải gửi tới các labo nội dung phân tích cụ thể các kiến thức liên quan trực tiếp đến kết quả xét nghiệm. Mỗi labo có một mật mã riêng vì vậy chỉ biết rõ điểm của mình và sự phân bố điểm chung của tất cả các labo nộp báo cáo.

## TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày định nghĩa chất lượng xét nghiệm vi sinh? Ý nào trong định nghĩa gây ấn tượng mạnh nhất đối với bạn, tại sao?
2. Vẽ và giải thích sơ đồ về các yếu tố ảnh hưởng đến xét nghiệm vi sinh?
3. Vẽ và giải thích sơ đồ qui trình chẩn đoán trực tiếp và gián tiếp?
4. Phân tích các tiêu chuẩn cơ bản của chất lượng xét nghiệm vi sinh?
5. Giải thích khái niệm nội kiểm và ngoại kiểm? Cho biết ý nghĩa của hai loại kiểm tra đánh giá chất lượng đó?



THƯ VIỆN  
HUBT

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

# ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG TRONG XÉT NGHIỆM VI SINH

## GIÁM SÁT CHẤT LƯỢNG - NỘI KIỂM

### (INTERNAL QUALITY CONTROL)

#### MỤC TIÊU

1. Trình bày được những quy định của 6 thành phần trong giám sát chất lượng xét nghiệm vi sinh.
2. Trình bày được khái quát về việc lưu trữ chủng vi khuẩn

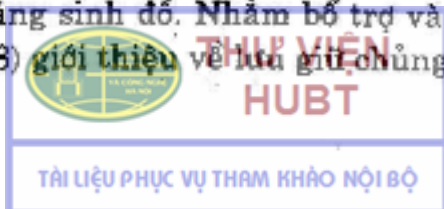
#### MỞ ĐẦU

Kết quả xét nghiệm có chất lượng tốt là kết quả xét nghiệm đó hỗ trợ được cho điều trị hoặc hỗ trợ được cho công tác dự phòng. Đảm bảo chất lượng là tập hợp tất cả những hoạt động của phòng xét nghiệm (labo) để đảm bảo rằng: kết quả xét nghiệm có chất lượng tốt.

Đảm bảo chất lượng gồm 2 khối công việc: bên trong và bên ngoài labo. Công việc bên trong labo - *internal quality control* gọi là: giám sát chất lượng, có thể gọi tắt là nội kiểm. Công việc bên ngoài labo - *external quality control* gọi là: đánh giá chất lượng, có thể gọi tắt là ngoại kiểm.

Công việc giám sát chất lượng - nội kiểm phải đạt 3 yêu cầu: Thiết thực, khả thi và kinh tế. Nó phải được tiến hành hàng ngày. Dựa vào tầm quan trọng của từng thành phần đối với chất lượng của toàn bộ xét nghiệm mà phải đánh giá xem qui trình xét nghiệm, các thuốc thử, môi trường nuôi cấy ... có phù hợp với công việc thực tế không.

Công việc giám sát chất lượng bao gồm 6 thành phần: một là thường qui làm việc trong labo; hai là bảo dưỡng máy, thiết bị; ba là môi trường nuôi cấy; bốn là thuốc nhuộm và thuốc thử; năm là kháng nguyên chẩn đoán và kháng huyết thanh; sáu là kháng sinh đồ. Nhằm bổ trợ và hoàn thiện việc giám sát chất lượng, mục (7) và (8) giới thiệu về lưu giữ chủng và labo chuẩn thức.



## 1. THƯỜNG QUI LÀM VIỆC TRONG LABO VI SINH

Những qui định chung cho tác phong làm việc trong labo vi sinh phải được tuân thủ nghiêm chỉnh (xem bài "*Qui định về làm việc trong phòng xét nghiệm vi sinh*" của học phần *Kỹ thuật xét nghiệm cơ bản*). Nhằm đánh giá chất lượng labo vi sinh còn phải có qui định cho những công việc cụ thể sau đây:

1. Có qui định về vệ sinh (lau chùi sạch sẽ) chỗ làm việc ; vệ sinh cá nhân; chỗ ăn nghỉ tách hẳn chỗ làm việc.
2. Có thường qui về bảo dưỡng máy, thiết bị.
3. Có qui định rõ trong việc thu nhận bệnh phẩm ; vào sổ đầy đủ thông tin của người bệnh; loại bỏ bệnh phẩm không đạt yêu cầu.
4. Có qui trình xét nghiệm từng loại bệnh phẩm và được cập nhật thường xuyên.
5. Có qui định về việc vào sổ (ghi chép) các kết quả xét nghiệm.
6. Có qui định về việc báo cáo kết quả xét nghiệm.
7. Có qui định về quản lý và kiểm soát tài liệu, sổ sách của labo.

Những qui định này phải được thực hiện đầy đủ, rà soát lại đều đặn và cập nhật thường xuyên.

## 2. BẢO DƯỠNG MÁY, THIẾT BỊ

Chất lượng xét nghiệm không thể tách rời chất lượng của máy, thiết bị. Do vậy, từng loại thiết bị phải được bảo dưỡng thường xuyên, được giám sát hoạt động và được bảo trì, thanh tra kỹ thuật định kỳ. Riêng tủ ấm cần phải theo dõi nhiệt độ hàng ngày và hàng tuần với tủ lạnh. Những qui định này được tổng hợp trong bảng 14.1 và bảng 14.2 dưới đây.

**Bảng 14.1. Kiểm tra chất lượng máy, thiết bị**

Tên máy	Bảo dưỡng thường xuyên	Giám sát	Bảo trì và thanh tra kỹ thuật
Lò hấp	Làm sạch và thay nước hàng tháng	- Kiểm tra & bổ sung nước trước khi bật lò. - Mỗi lần vận hành ghi chép thời gian hấp, nhiệt độ & áp suất. - Kiểm tra bằng chỉ điểm hoá học mỗi lần hấp và bằng chỉ điểm sinh học hàng tuần.	6 tháng một lần (bằng các thông số kỹ thuật).
Tủ sấy	Làm sạch bên trong hàng tháng.	Ghi chép thời gian, nhiệt độ mỗi lần sấy.	6 tháng một lần bằng nhiệt kế chuẩn.

**Bảng 14.1. (Tiếp)**

Tủ ấm	Làm sạch thành bên trong và các ngăn hàng tháng.	Ghi chép nhiệt độ mỗi ngày (cho phép $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).	6 tháng một lần bằng nhiệt kế chuẩn.
Tủ lạnh	Làm sạch và xả đá 2 tháng 1 lần và khi bị mất điện.	Ghi chép nhiệt độ vào ngày đầu tuần (nhiệt độ cho phép $2 - 8^{\circ}\text{C}$ ).	6 tháng một lần bằng nhiệt kế chuẩn.
Kính hiển vi	Chống bụi khi không sử dụng. Lau các thấu kính bằng khăn chuyên dụng mỗi khi sử dụng xong.	Chống bụi, chống ẩm, chống mốc.	Hàng năm
Máy li tâm	Lau chùi thành bên trong bằng dung dịch sát khuẩn hàng tuần hoặc khi ống nghiệm bị vỡ hoặc đánh đổ.	Rotor khô, sạch & luôn đủ cao su lót đáy ống li tâm.	Hàng năm

**Bảng 14.2. Bảng theo dõi nhiệt độ của thiết bị**

Tên thiết bị .....

Nhiệt độ : .....

Phòng số ...

Ngày	Tháng 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1													1
2													2
3													3
4													4
5													5
6													6
7													7
8													8
9													9
10													10
28													28
29													29
30													30
31													31



**THƯ VIỆN  
HUBT**

TÀI LIỆU PHỤC VỤ THAM KHẢO NỘI BỘ

### 3. MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn có thể tự sản xuất từ các hoá chất đơn lẻ hoặc dùng sản phẩm thương mại – bột pha sẵn.

#### 3.1. Lựa chọn môi trường

Nên dùng một môi trường cơ bản để điều chế những môi trường khác nhau, ví dụ dùng môi trường cơ bản để điều chế môi trường thạch máu, môi trường sôcôla và môi trường phân lập. Nếu muốn phân lập được vi khuẩn gây bệnh từ bệnh phẩm lẫn tạp nên dùng môi trường có khả năng tách được vi khuẩn cần tìm tốt nhất; ví dụ nếu tìm vi khuẩn thương hàn trong phân nên chọn môi trường DCA (Deoxycholate Citrate Agar) hoặc môi trường SS (Salmonella - Shigella).

#### 3.2. Bảo quản môi trường bột pha sẵn

- Chỉ nên mua số lượng đủ dùng trong 6 tháng hoặc tối đa là 1 năm.
- Hộp môi trường mới mua phải còn nguyên vòng bảo hiểm.
- Viết ngày tháng tiếp nhận lên vỏ hộp.
- Để ở nơi thoáng, mát, tránh ánh sáng.
- Khi mở hộp để sử dụng phải ghi ngày tháng mở hộp lên vỏ.

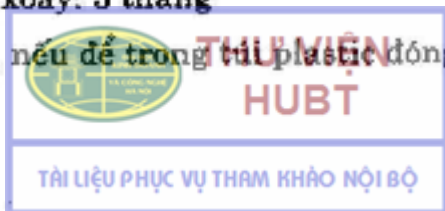
**Chú ý:** Môi trường bột pha sẵn hút nước trong không khí nên khi môi trường đóng vón hoặc chuyển màu sẫm thì phải loại bỏ.

#### 3.3. Pha chế môi trường

- Thực hiện đúng như hướng dẫn của hãng sản xuất.
- Sử dụng hết khối lượng trước khi hết hạn.

#### 3.4. Lưu trữ môi trường đã pha chế

- Tránh nhiệt độ cao. Môi trường có máu hoặc chất hữu cơ khác hay môi trường có kháng sinh phải cất trong tủ lạnh.
- Dù có lưu trữ đúng qui định, môi trường đã pha chế cũng chỉ còn tốt trong một thời gian nhất định, cụ thể:
  - + Trong ống nghiệm nút bông: 3 tuần
  - + Trong lọ có nút xoáy: 3 tháng
  - + Trong đĩa petri, nếu để trong tủ plastic đóng kín: 4 tuần.





<b>- Beta-lactamase (+)</b> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>Vibrio cholerae</i> non-O1 <b>Nấm</b> <i>Candida albicans</i>
---	---

**Bảng 14.4. Một số thử nghiệm để kiểm tra môi trường thông thường**

Môi trường	Thời gian ủ ấm	Chủng mẫu	Kết quả mong đợi
Canh thang nitrat	24 giờ	<i>E. coli</i> <i>A. lwoffii</i>	Dương tính Âm tính
Đỏ methyl / VP (Voges-Proskauer)	48 giờ	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Dương tính / Âm tính Âm tính / Dương tính
KIA (Kligler iron agar) (phần cột thạch: cao ít nhất 2.5 cm)	24 giờ	<i>C. freundii</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. flexneri</i> <i>A. lwoffii</i>	Mặt nghiêng acid, khí + H <sub>2</sub> S Mặt nghiêng kiềm, khí + H <sub>2</sub> S Mặt nghiêng kiềm Không thay đổi
McConkey có tím tinh thể	24 giờ	<i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i> <i>P. mirabilis</i>	Khuẩn lạc màu đỏ Không mọc Khuẩn lạc không màu (không lan tỏa)
Môi trường OF dextrose (oxidation/fermentation) (không có dầu)	24 giờ	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. lwoffii</i>	Oxy hoá bề mặt Không thay đổi
Môi trường urê	24 giờ	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>	Âm tính Dương tính (hồng đỏ)
Pepton (indol)	24 giờ	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Dương tính Âm tính
TCBS (thiosulfate citrate bill salts)	24 giờ	<i>Vibrio spp non-O1</i>	Khuẩn lạc màu vàng
Thạch aesculin - muối mặt	24 giờ	<i>E. faecalis</i> <i>Streptococcus tan máu alpha</i>	Có mọc và màu đen Không mọc
Thạch manitol muối (Chapman)	24 giờ	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i>	Khuẩn lạc màu vàng Khuẩn lạc màu hồng Không mọc
Thạch máu	24 giờ, CO <sub>2</sub> (nén)	<i>S. pyogenes</i> <i>S. pneumoniae</i>	Mọc và tan máu beta Mọc và tan máu alpha

**Bảng 14.4. (tiếp)**

Thạch Mueller-Hinton :  Cho mỗi đợt nhập môi trường mới	24 giờ	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 hoặc 33186 và khoan co-trimoxazol	Đường kính vùng ức chế nằm trong khoảng cho phép (xem bảng 14.7)  Vùng ức chế rõ ràng (không có khuẩn lạc li ti) với đường kính $\geq 20$ mm.
Thạch Simon citrat	48 giờ	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Không mọc Có mọc, màu xanh
Thạch sôcôla	24 giờ, CO <sub>2</sub>	<i>H. influenzae</i>	Có mọc
Thạch SS (Salmonella-Shigella Agar)	24 giờ	<i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. flexneri</i>	Không mọc Khuẩn lạc không màu Khuẩn lạc không màu
Thạch Thayer-Martin	24 giờ, CO <sub>2</sub>	<i>N. meningitidis</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>E. coli</i> <i>C. albicans</i>	Có mọc Có mọc Không mọc Không mọc Không mọc

#### 4. THUỐC NHUỘM VÀ THUỐC THỬ

- Có thể tự pha chế theo công thức hoặc mua dung dịch đã pha sẵn.
- Không dùng khi đã quá hạn sử dụng của nhà sản xuất.
- Nhìn thấy có dấu hiệu hỏng (đục, vẩn, đổi màu).

Hướng dẫn kiểm tra chất lượng một số thuốc thử được tổng hợp trong bảng 14.5 và thuốc nhuộm trong bảng 14.6 dưới đây.

**Bảng 14.5. Kiểm tra chất lượng một số thuốc thử thường dùng.**

Thuốc thử	Chủng vi khuẩn thử nghiệm		Môi trường
	(+)	(-)	
Catalase*	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	TSA (Tryptic soy agar) để cấy chuyển chủng.
Coagulase*	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	
Oxidase*	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	
Khoan bacitracin	<i>S. pyogenes</i> (có vùng ức chế)	<i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i>	Thạch máu



**Bảng 14.5. (Tiếp)**

Khoanh optochin	<i>S. pneumoniae</i> (có vùng ức chế)	<i>S. mitis</i>	Thạch máu
Khoanh tellurit	<i>E. faecalis</i> (không có vùng ức chế)	<i>S. agalactiae</i> (có vùng ức chế)	Thạch máu
Khoanh V-factor	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. influenzae</i>	TSA
Khoanh XV-factor	<i>H. influenzae</i>		TSA

Ghi chú: \* cách thức tiến hành kiểm tra được hướng dẫn cụ thể khi thực hành.

**Bảng 14.6. Kiểm tra chất lượng thuốc nhuộm thương dùng.**

Thuốc nhuộm	Chủng vi khuẩn thử nghiệm		Biện pháp kiểm tra
	(+)	(-)	
Thuốc nhuộm Gram	Staphylococcus màu tím	<i>Escherichia coli</i> màu đỏ	Trộn hai loài vi khuẩn, dàn tiêu bản, nhuộm.
Thuốc nhuộm Ziehl-Neelsen	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> màu hồng	Tạp khuẩn không kháng cồn- acid màu xanh	Dàn tiêu bản đờm bệnh nhân lao có vi khuẩn lao (+++), cố định, đóng gói lưu trữ.

## 5. KHÁNG NGUYÊN CHẨN ĐOÁN VÀ KHÁNG HUYẾT THANH

Để kết quả chẩn đoán (xác định kháng nguyên hoặc kháng thể) chính xác phải chú ý:

- Thực hiện đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu trữ ở nhiệt độ đã khuyến cáo; có một số sinh phẩm không được để ở khoang đá.
- Tránh đông băng và làm tan đá nhiều lần. Trước khi để đông băng, chia kháng huyết thanh thành những lượng nhỏ đủ dùng cho một số ít thử nghiệm.
- Loại bỏ khi quá hạn sử dụng.
- Kháng huyết thanh dùng cho phản ứng ngưng kết cần phải thử với chủng vi khuẩn thuần nhất và mới cấy chuyển.
- Luôn phải thử song song với huyết thanh (+) và (-) mẫu để đối chứng; huyết thanh này có thể mua từ hãng sản xuất nhưng cũng có thể dùng huyết thanh bệnh nhân đã được xác định trước đó.
- Nếu có thể thì huyết thanh chứng (control) cần biết rõ hiệu lực (potency) được tính bằng IU/ml (international unit per mililit).

- Một số trường hợp phải thử với mẫu huyết thanh kép trong cùng một điều kiện thí nghiệm.
- Mỗi bộ (kit) chẩn đoán huyết thanh học phải gồm có:
  - + 1 huyết thanh âm tính (kiểm tra độ đặc hiệu).
  - + 1 huyết thanh dương tính yếu (kiểm tra độ nhạy).
  - + 1 huyết thanh dương tính mạnh (kiểm tra định lượng).

Ghi chép tất cả hiệu giá của các huyết thanh kiểm tra.

## 6. KHÁNG SINH ĐỒ

Kết quả của kỹ thuật kháng sinh đồ cải tiến theo Kirby-Bauer bị chi phối bởi nhiều yếu tố kỹ thuật (xem thêm bài *Kháng sinh đồ* trong *Giáo trình Thực tập Vi sinh vật Y học*, Đại học Y Hà Nội, 2007). Để tránh sai sót kết quả cần chú ý:

- Khoanh giấy kháng sinh phải có hiệu lực, hàm lượng chính xác.
- Lưu trữ lâu phải đông băng ( $ở -20^{\circ}C$ ).
- Những khoanh giấy dùng hàng ngày để ở tủ lạnh ( $2-8^{\circ}C$ ), không quá 1 tháng.
- Chỉ dùng môi trường Mueller-Hinton.
- pH môi trường = 7,2 – 7,4.
- Huyền dịch vi khuẩn phải đúng so với độ đục chuẩn để đảm bảo mật độ khuẩn lạc mọc trên đĩa thử nghiệm.
- Đo đường kính vùng ức chế chính xác.
- Ba chủng chuẩn là *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 và *P. aeruginosa* ATCC 27853 ; đường kính vùng ức chế (ĐKVƯC) phải nằm trong khoảng cho phép (xem bảng 14.7).

Một khi ĐKVƯC nằm ngoài khoảng cho phép, phải tìm sai sót để khắc phục: có thể do lỗi kỹ thuật hoặc có thể do hoá chất (môi trường, khoanh giấy kháng sinh, ...).

- Cần thử nghiệm với 3 chủng chuẩn khi:
  - + Mỗi đợt nhập hoặc bắt đầu sử dụng một lô khoanh giấy mới.
  - + Mỗi đợt nhập hoặc đưa vào sử dụng lô môi trường mới.
  - + Mỗi tuần một lần song song với các chủng cần thử nghiệm.
- Theo dõi, đánh giá chất lượng bằng biểu đồ.

**Bảng 14.7.** Giới hạn đường kính vùng ức chế cho 3 chủng chuẩn theo CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

Kháng sinh	Hàm lượng/ khoanh giấy	Đường kính vùng ức chế (mm)		
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Amikacin	30 µg	20-26	19-26	18-26
Amoxi/clav*	20/10 µg	28-36	19-25	-
Ampicillin	10 µg	27-35	16-22	-
Bezylpenicillin	10 IU	26-37	-	-
Cefalotin	30 µg	29-37	15-21	-
Ceftazidim	30 µg	16-20	25-32	22-29
Cefotaxim	30 µg	25-31	29-35	18-22
Ceftriaxon	30 µg	22-28	29-35	17-23
Cefuroxim	30 µg	27-35	20-26	-
Cloramphenicol	30 µg	19-26	21-27	-
Ciprofloxacin	5 µg	22-30	30-40	25-33
Clindamycin	2 µg	24-30	-	-
Co-trimoxazol	25 µg	24-32	24-32	-
Erythromycin	15 µg	22-30	-	-
Gentamicin	10 µg	19-27	19-26	16-21
Nalidixic acid	30 µg	-	22-28	-
Nitrofurantoin	300 µg	18-22	20-25	-
Norfloxacin	10 µg	17-28	28-35	22-29
Oxacillin	1 µg	18-24	-	-
Piperacillin	100 µg	-	24-30	25-33
Tetracyclin	30 µg	24-30	18-25	-
Tobramycin	10 µg	19-29	18-26	19-25
Trimethoprim	5 µg	19-26	21-28	-
Vancomycin	30 µg	17-21	-	-

\* Amoxicillin/ acid clavulanic (chất ức chế beta-lactamase).

**Lưu ý:** khi thử nghiệm với các kháng sinh có chất ức chế beta-lactamase cần kiểm tra bằng chủng chuẩn *E. coli* ATCC 35218 và đường kính vùng ức chế có giới hạn riêng.



## 7. GIỮ CHỨNG

### 7.1. Lưu trữ cho thời gian dài

Lưu trữ cho thời gian dài là sau khoảng thời gian nhiều tháng hoặc nhiều năm mới phải cấy chuyển. Biện pháp tốt nhất là đông khô hoặc ở nhiệt độ âm sâu ( $-70^{\circ}\text{C}$  hoặc thấp hơn) trong tủ chạy điện hay trong bình nitơ lỏng.

Dưới đây, chúng tôi giới thiệu một số biện pháp giữ chủng khác để bạn đọc tham khảo, tùy theo khả năng sẵn có và yêu cầu cụ thể mà áp dụng.

#### 7.1.1. Glycerol ở $-20^{\circ}\text{C}$

- Cấy chủng thuần trên môi trường đặc.
- Khi vi khuẩn đã phát triển tốt, lấy 1 quai cấy.
- Hoà vào glycerol trung tính đã tiệt trùng.
- Chia vào lọ hoặc ống nghiệm có nắp xoáy, mỗi lọ 1-2ml.
- Cất ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Tránh lặp lại đông băng và tan đá.
- Cấy chuyển sau 12-18 tháng.

**7.1.2. Cắm chủng ở nhiệt độ phòng:** chỉ áp dụng được cho những chủng dễ mọc, ví dụ tụ cầu, trực khuẩn đường ruột.

- Đổ môi trường thạch ống đứng, nên dùng TSA (tryptic soy agar).
- Cấy vi khuẩn bằng cách cắm một đường thẳng đứng vào giữa cột thạch.
- Ủ ấm ở nhiệt độ  $35^{\circ}\text{C}$  qua đêm.
- Đóng kín bằng nút bấc hoặc nắp xoáy.
- Nhúng phần có nắp (nút) vào parafin nóng chảy để hàn kín.
- Giữ ở nhiệt độ phòng.
- Cấy chuyển sau 1 năm.

**7.1.3. Cấy cắm trong CTA** (cystein trypticase agar) cho các neisseria và streptococci

- Đổ ống môi trường CTA.
- Cấy cắm vi khuẩn vào môi trường; ủ ấm ở nhiệt độ  $35^{\circ}\text{C}$  qua đêm.
- Đóng kín bằng nút bấc hoặc nút xoáy.
- Nhúng phần nắp vào parafin nóng chảy để hàn kín.
- Với neisseria giữ ở nhiệt độ  $35^{\circ}\text{C}$  và cấy chuyển 2 tuần một lần; với streptococci để ở nhiệt độ phòng, cấy chuyển 1 tháng một lần.

## 7.2. Lưu trữ trong thời gian ngắn

Những chủng mẫu cần dùng hàng ngày, lưu trữ như sau:

### 7.2.1. Với vi khuẩn phát triển nhanh

- Cấy trên thạch nghiêng TSA trong ống nghiệm có nút xoáy.
- Ủ ấm ở nhiệt độ 35°C qua đêm.
- Cất trong tủ lạnh.
- Hai tuần cấy chuyển một lần.

### 7.2.2. Với streptococci

- Cấy trên ống thạch máu nghiêng có nút xoáy.
- Ủ ấm ở nhiệt độ 35°C qua đêm.
- Giữ ở nhiệt độ phòng.
- 2 tuần cấy chuyển một lần.

### 7.2.3. Với màng não cầu và *H. influenzae*

- Cấy trên thạch sôcôla.
- Ủ ấm ở nhiệt độ 35°C qua đêm.
- Giữ ở nhiệt độ phòng.
- Hai tuần cấy chuyển một lần.

### 7.2.4. Với lậu cầu

- Cấy trên thạch sôcôla; ủ và giữ ở nhiệt độ 35°C qua đêm.
- Hai ngày cấy chuyển một lần.
- Đối chủng cho kiểm tra chất lượng khi phân lập được chủng mới.

## 8. LABO CHUẨN THỨC

Labo chuẩn thức (reference laboratory) là phòng thí nghiệm có khả năng cung cấp những chủng mẫu (cho việc kiểm tra chất lượng và tổ chức tập huấn khi có nhu cầu), cung cấp huyết thanh chuẩn và thuốc thử chuẩn nhằm so sánh với các sinh phẩm đang sử dụng tại các labo thành viên.

Ở Việt Nam, một labo chuẩn về xét nghiệm vi sinh đang được Bộ Y tế xét duyệt để hình thành.



Nếu không có các chương trình đánh giá chất lượng từ bên ngoài thì labo chuẩn nên cung cấp bệnh phẩm hoặc chủng vi khuẩn mù đã được ghi mã số cho các labo thành viên để họ tự kiểm tra khả năng phân lập và định danh.

***Những bệnh phẩm yêu cầu phải chuyển cho labo chuẩn là:***

- Những bệnh phẩm ít gặp hoặc cần những thử nghiệm đặc hiệu cao; ví dụ xét nghiệm virus, chẩn đoán huyết thanh bệnh nhiễm ký sinh trùng.
- Một số trường hợp phải lấy đúp bệnh phẩm (2 bệnh phẩm cùng một lúc): một để gửi đi labo chuẩn; một để tự xét nghiệm nhằm kiểm tra kết quả.
- Những bệnh phẩm cần xác định kỹ càng hơn về tác nhân gây bệnh vì khả năng gây bệnh thành dịch, ví dụ thương hàn, lỵ, tả, phế cầu, màng não cầu ...

## **TỰ LƯỢNG GIÁ**

1. Liệt kê 6 thành phần của công việc giám sát chất lượng (IQC - internal Quality Control) nhằm đảm bảo chất lượng xét nghiệm vi sinh.
2. Liệt kê 7 qui định của thường qui làm việc trong labo vi sinh.
3. Trình bày những qui định về bảo dưỡng máy, thiết bị trong labo vi sinh.
4. Trình bày những qui định nhằm đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy vi khuẩn.
5. Trình bày các thử nghiệm kiểm tra chất lượng thuốc thử và thuốc nhuộm.
6. Trình bày những qui định về đảm bảo chất lượng kháng nguyên và kháng huyết thanh trong chẩn đoán vi sinh.
7. Trình bày những qui định nhằm đảm bảo chất lượng kháng sinh đồ.
8. Nêu tóm tắt cách lưu giữ chủng trong thời gian dài và thời gian ngắn.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Huy Chính, Đinh Hữu Dung, Bùi Khắc Hậu, Lê Hồng Hinh, Lê Thị Oanh, Lê Văn Phụng, Nguyễn Thị Tuyền, Nguyễn Thị Vinh và Nguyễn Vũ Trung (2007).

Vi sinh y học. Nhà xuất bản Y học.

2. Lê Huy Chính, Đinh Hữu Dung, Bùi Khắc Hậu, Lê Hồng Hinh, Lê Thị Oanh, Lê Văn Phụng, Nguyễn Vũ Trung, Nguyễn Thị Tuyền và Nguyễn Thị Vinh (2007).

Giáo trình thực tập vi sinh y học. Trường Đại học Y Hà Nội.

3. Etienne Levy-Lambert (1978).

(Nguyễn Viết Thọ và Nguyễn Xuân Thiều dịch).

Kỹ thuật cơ bản của phòng xét nghiệm. Nhà xuất bản Y học.

4. Hoàng Thủy Long (1991).

Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh y học. Nhà xuất bản Văn hoá.

5. A. Balows, W.J. Hausler, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (1991).

Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology.

6. A. Barrow and R.K.A. Feltham (1993).

Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria  
Cambridge University Press.

7. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2006).

Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test;  
Approved Standard - Ninth Edition, Vol. 26 Nr.1. Pennsylvania.

8. J. Douglas Sleight, Morag C. Timbury (1998).

Notes on Medical of Bacteriology. Churchill Livingstone.

9. J. Vandepitte and J. Verhaegen, K. Engbaek, P. Rohner, P. Pilot & C.C. Heuck (2003):

Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, WHO, Geneva.

