

# TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN SẢN XUẤT MẪU BỆNH PHẨM GIẢ ĐỊNH MỦ, ĐỜM CHỨA VI KHUẨN THƯỜNG GẶP PHỤC VỤ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM VI SINH LÂM SÀNG

TRẦN HỮU TÂM, VÕ NGỌC NGUYỄN, TRƯƠNG QUÂN  
THỤY,  
NGUYỄN THỊ THANH TÂM, NGUYỄN HỮU LỄ,  
NGUYỄN THỊ THANH HÒA, LÊ HIẾU NGHĨA.  
Trung tâm Kiểm chuẩn Xét nghiệm TP.HCM

## TÓM TẮT

Một trong những công cụ để đánh giá độ tin cậy của xét nghiệm vi sinh lâm sàng là ngoại kiểm tra chất lượng (EQAs), để triển khai được hoạt động ngoại kiểm tra chất lượng, cần phải có các mẫu kiểm chuẩn.

Dựa trên kết quả khảo sát các mẫu bệnh phẩm và vi khuẩn thường gặp tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng [3], nhóm nghiên cứu đã xây dựng quy trình sản xuất mẫu bệnh phẩm giả định mủ, đờm chứa vi khuẩn gây bệnh thường gặp và vi khuẩn thường trú, tiến hành các thí nghiệm sàng lọc và tối ưu hóa theo ma trận Plackett – Burman, phương pháp đường dốc nhất, phương pháp hàm đáp ứng bề mặt – cấu trúc có tâm (RSM – CCD). Kết quả đã xác định được điều kiện sản xuất và tìm ra được công thức tối ưu với các thành phần chi tiết có thể áp dụng sản xuất hai mẫu bệnh phẩm giả định chứa vi khuẩn gây bệnh và vi khuẩn thường trú gồm: mẫu mủ (*S.aureus*, *P. aeruginosa*), mẫu đờm (*Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, vi khuẩn thường trú *Streptococcus mitis*).

**Từ khóa:** ngoại kiểm, mủ, đờm, Plackett – Burman, RSM – CCD.

## SUMMARY

One of the tools for evaluating the reliability of diagnosis is external quality assessment scheme (EQAs), which is required the materials for expanding.

Base on the results of survey the common samples and bacteria at the clinical microbiology laboratories [3], we set up the process for manufacturing of EQAs samples (pus, sputum), which contain the malignant and contaminated bacteria, then we do the screening experiments, optimize them following the Plackett – Burman matrix, the steepest descent method, response surface methodology - central composite design (RSM – CCD). Finally, we find out the condition for manufacturing and the ingredient with the best selecting factors for manufacturing EQAs samples containing the malignant and contaminated bacteria: pus (*S. aureus*, *P. aeruginosa*), sputum (*Acinetobacter baumannii*, *P.*

*aeruginosa*, contaminated *Streptococcus mitis*).

**Keywords:** EQAs, pus, sputum, Plackett – Burman, RSM – CCD.

## ĐẶT VẤN ĐỀ:

Hiện nay mẫu sử dụng cho chương trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm vi sinh lâm sàng tại Việt Nam chưa có đơn vị nào cung cấp. Do đó, muốn triển khai ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm vi sinh lâm sàng cần phải nghiên cứu sản xuất mẫu bệnh phẩm giả định chứa các vi khuẩn thường gặp (gây bệnh, thường trú), một trong những yêu cầu quan trọng đó là mẫu phải đáp ứng tiêu chí bảo quản vi khuẩn gây bệnh (hoặc thường trú) theo quy định của một mẫu dùng cho ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm. Theo đó, mẫu phải duy trì được nồng độ vi khuẩn ở tình trạng tối ưu, đảm bảo phòng xét nghiệm có thể thực hiện được các xét nghiệm vi sinh tại thời điểm nhận mẫu [2], [7], [8].

Nhằm xác định công thức tối ưu cho việc sản xuất mẫu bệnh phẩm giả định mủ, đờm phục vụ công tác ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm, nhóm đã tiến hành các nghiên cứu, với mục đích đánh giá mức độ ảnh hưởng của các yếu tố tham gia vào quá trình sản xuất, môi trường cơ chất, qua đó xác định được những yếu tố cụ thể, với nồng độ, hàm lượng tương ứng, ảnh hưởng đến việc bảo quản vi khuẩn trên mẫu. Từ đó xác định các điều kiện sản xuất tối ưu áp dụng cho sản xuất mẫu bệnh phẩm giả định mủ và đờm.

## ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

### 1. Đối tượng:

Mẫu bệnh phẩm giả định mủ, đờm.

Vi khuẩn *S.aureus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus mitis*.

Thời gian bảo quản, nhiệt độ bảo quản, nồng độ vi khuẩn ban đầu, 11 thành phần tham gia tạo cơ chất của môi trường nuôi cấy.

### 2. Phương pháp:

Sàng lọc và tối ưu hóa các yếu tố, thành phần

dựa trên việc thiết kế các mô hình thí nghiệm: (i) thiết kế sàng lọc yếu tố thí nghiệm theo ma trận Plackett-Burman; (ii) thiết kế thí nghiệm leo dốc bằng phương pháp tối ưu hóa theo đường dốc nhất; (iii) thiết kế tối ưu hóa theo phương pháp hàm đáp ứng bề mặt – cấu trúc có tâm (RSM – CCD) [1], [4], [6].

Nuôi cấy vi khuẩn, đếm và tính toán nồng độ vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy [5].

Phân tích các số liệu thu được bằng phần mềm Design expert 7.0.0, Stata 10.0, excel.

### KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN:

Chúng tôi trình bày kết quả chi tiết của mẫu mũ, đánh giá trên kết quả nuôi cấy đối với *S. aureus*, đối với các chủng vi khuẩn khác hoặc mẫu đờm thì cách tiến hành và phân tích, biện luận tương tự.

#### 1. Các yếu tố ảnh hưởng

Do yêu cầu sản xuất mẫu dùng cho ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm, do đó một số yếu tố phải đáp ứng yêu cầu bắt buộc. Cụ thể các yếu tố sau sẽ phải đáp ứng và được cố định: thời gian bảo quản tối ưu là 15 ngày; nhiệt độ bảo quản là 25 - 30 oC (phù hợp

#### 2. Kết quả thiết kế sàng lọc yếu tố thí nghiệm theo ma trận Plackett-Burman

Bảng 2. Kết quả thí nghiệm sàng lọc theo Plackett-Burman đối với mẫu Mũ chứa *S. aureus*

với nhiệt độ vận chuyển mẫu, gửi mẫu bằng xe chuyên dụng hoặc gửi qua bưu điện cho đơn vị); nồng độ vi khuẩn gây bệnh là 108 CFU/ml, nồng độ vi khuẩn thường trú là 104 CFU/ml. Như vậy cần tối ưu hóa 11 yếu tố tham gia vào thành phần cơ chất:

Bảng 1. Các yếu tố cần tối ưu hóa bằng các mô hình thí nghiệm

STT	Tên yếu tố	Mức dưới (-1)	Mức trên (+1)
1	NaCl (mg/ml)	2	6
2	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (mg/ml)	0,05	0,1
3	MgCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (mg/ml)	0,1	0,5
4	Sodium thioglycolate (mg/ml)	0,5	2
5	Sodium glycerophosphate (mg/ml)	5	15
6	Glycerol (%)	5	10
7	Pepton thịt (mg/ml)	2	4
8	Cao nấm men (mg/ml)	0,5	2
9	Glucose (mg/ml)	0,5	2
10	pH	5	7,5
11	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mg/ml)	1,5	2,5

Thí nghiệm	Các yếu tố											S. aureus Log (CFU/ml)	
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	Thực nghiệm	Mô hình
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	7,27	7,32
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	7,27	7,22
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	6,37	6,36
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	6,03	6,01
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	7,05	7,09
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	6,53	6,48
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	7,46	7,42
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	7,39	7,41
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	7,43	7,42
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	7,40	7,41
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	4,95	4,97
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	6,68	6,72

Ma trận Plackett-Burman thu được nồng độ vi khuẩn *S. aureus* từ 8,84 x 10<sup>4</sup> CFU/ml đến 2,88 x 10<sup>7</sup> CFU/ml (tính toán từ kết quả log = 4,95 và 7,46). Kết quả này cho thấy sự khác biệt giữa mô hình và thực nghiệm của nồng độ vi khuẩn gây bệnh tạo thành dựa trên 11 yếu tố theo dõi. Từ đó làm cơ sở cho việc xác định những yếu tố nào ảnh hưởng nhất đối với chỉ tiêu theo dõi này. Giá trị ảnh hưởng của các yếu tố được thể hiện ở Bảng 3 bên dưới:

Bảng 3. Kết quả phân tích mức ảnh hưởng của các yếu tố khảo sát của mẫu Mũ chứa *S. aureus*

Ký hiệu	Yếu tố	Mức		Mật độ vi khuẩn S. aureus	
		Thấp (-1)	Cao (+1)	Ảnh hưởng	Prob > F
X1	NaCl (mg/ml)	2	6	-0,015b	0,1000
X2	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (mg/ml)	0,05	0,1	0,63a	0,0005
X3	MgCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (mg/ml)	0,1	0,5	-0,15a	0,0307
X4	Sodium thioglycolate (mg/ml)	0,5	2	-0,79a	0,0003
X5	Sodium glycerophosphate (mg/ml)	5	15	-0,29a	0,0046
X6	Glycerol (%)	5	10	0,32a	0,0036
X7	Pepton thịt (mg/ml)	2	4	0,058b	0,1236

Yếu tố		Mức		Mật độ vi khuẩn <i>S. aureus</i>	
Ký hiệu	Tên yếu tố	Thấp (-1)	Cao (+1)	Ảnh hưởng	Prob > F
X8	Cao nấm men (mg/ml)	0,5	2	0,26a	0,0065
X9	Glucose (mg/ml)	0,5	2	-0,51a	0,0009
X10	pH	5	7,5	0,74a	0,0003
X11	K2HPO4 (mg/ml)	1,5	2,5	0,028b	0,3100

Ghi chú: a Có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,1$ ; b Không có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,1$

Ba yếu tố có giá trị ảnh hưởng dương và lớn sẽ ảnh hưởng tới chỉ tiêu theo dõi trên ( $p < 0,1$ ) là: pH, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O và glycerol. Các yếu tố còn lại có ảnh hưởng không đáng kể đến nồng độ *S. aureus* ở độ tin cậy  $p < 0,1$ . Do đó, nhóm nghiên cứu chọn pH, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O và glycerol là những yếu tố cần tối ưu hóa để đưa vào thiết kế các thí nghiệm tiếp theo.

Từ kết quả phân tích ANOVA của ma trận Plackett-Burman, ta thu được phương trình hồi quy bậc 1:

$$\hat{y} = 6,819 + 0,313B + 0,161F + 0,371K$$

Trong đó: B: CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (mg/ml); F: Glycerol (%); K: pH

Tính toán lại ngưỡng khảo sát của các yếu tố ảnh hưởng từ kết quả phân tích ANOVA của ma trận Plackett-Burman dựa trên việc lựa chọn bước nhảy (khoảng biến thiên) mới.

Bảng 4. Kết quả tính bước nhảy mới cho 03 yếu tố ảnh hưởng đến *S. aureus*

	Các yếu tố		
	B (mg/ml)	F (%)	K
Mức cơ sở	0,075	7,5	6,25
Khoảng biến thiên $\Delta_j$	0,025	2,5	1,25
Mức dưới (-1)	0,05	5	5
Mức trên (+1)	0,1	10	7,5
Hệ số $b_j$	0,313	0,161	0,371
Tích số $b_j$ và khoảng biến thiên ( $b_j \Delta_j$ )	0,008	0,403	0,464

Bước nhảy (khoảng biến thiên) mới được lựa chọn dựa trên hệ số  $b_j$  nhỏ nhất trong 03 yếu tố ảnh hưởng. Do đó, bước nhảy mới sẽ được lựa chọn theo yếu tố F (glycerol) là 0,3.

Các bước nhảy của yếu tố B, K được tính theo công thức sau:

$$\delta_B = 0,3 \times \frac{b_B \Delta_B}{b_F \Delta_F} = 0,3 \times \frac{0,008}{0,403} \approx 0,01$$

$$\delta_K = 0,3 \times \frac{b_K \Delta_K}{b_F \Delta_F} = 0,3 \times \frac{0,464}{0,403} \approx 0,3$$

Kết quả bước nhảy mới cho 03 yếu tố ảnh hưởng:  
Bảng 5. Bước nhảy mới của 03 yếu tố ảnh hưởng đến *S. aureus*

Yếu tố
--------

	B (mg/ml)	F (%)	K
Bước nhảy cũ	0,025	2,5	1,25
Bước nhảy mới	0,01	0,3	0,3

### 3. Kết quả thí nghiệm leo dốc bằng phương pháp tối ưu hóa theo đường dốc nhất

Kết quả thí nghiệm leo dốc của mẫu Mũ chứa *S. aureus* được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Thiết kế thí nghiệm leo dốc của mẫu Mũ chứa *S. Aureus*

Thí nghiệm	Các yếu tố ảnh hưởng			<i>S. aureus</i> CFU/ml
	B (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	F (Glycerol)	K (pH)	
1 (tại tâm)	0,08	7,5	6,3	1,42 x 10 <sup>6</sup>
2	0,09	7,8	6,6	1,63 x 10 <sup>6</sup>
3	0,10	8,1	6,9	1,84 x 10 <sup>6</sup>
4	0,11	8,4	7,2	1,71 x 10 <sup>6</sup>
5	0,12	8,7	7,5	1,58 x 10 <sup>6</sup>
6	0,13	9,0	7,8	9,15 x 10 <sup>5</sup>
7	0,14	9,3	8,1	5,76 x 10 <sup>5</sup>
8	0,15	9,6	8,4	4,70 x 10 <sup>5</sup>
9	0,16	9,9	8,7	1,97 x 10 <sup>5</sup>

Sau khi thực hiện 9 thí nghiệm leo dốc liên tiếp, chúng tôi đã lựa chọn lại ngưỡng khảo sát mới tối ưu hơn để tiến hành thí nghiệm tối ưu hóa theo phương pháp RSM-CCD. Phạm vi nghiên cứu của 3 yếu tố đối với mẫu mũ chứa *S. aureus* được thể hiện ở Bảng 7. Các yếu tố còn lại vẫn bổ sung vào môi trường bảo quản nhưng được cố định tại mức trung tâm.

Bảng 7. Phạm vi nghiên cứu của 3 yếu tố đối với mẫu mũ chứa *S. aureus*

Yếu tố	Phạm vi nghiên cứu	Mức				
		- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (mg/ml)	0,08 – 0,12	0,08	0,09	0,10	0,11	0,12
Glycerol (%)	7,6 – 8,6	7,6	7,8	8,1	8,4	8,6
pH	6,4 – 7,4	6,4	6,6	6,9	7,2	7,4

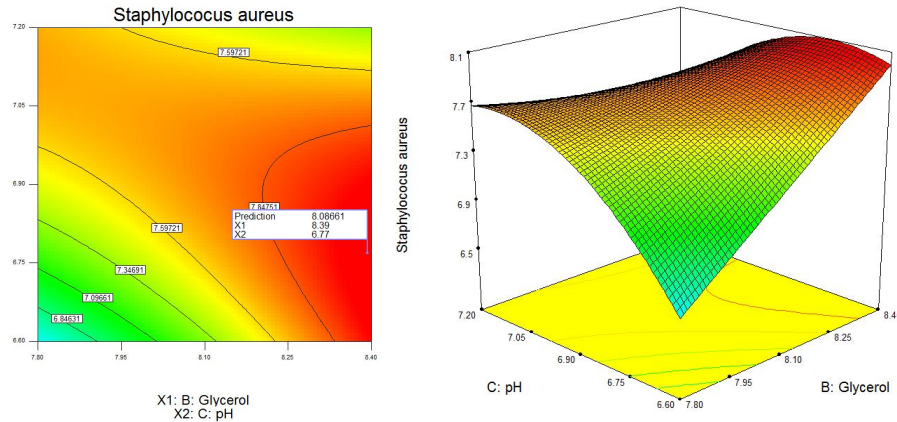
### 4. Kết quả tối ưu theo RSM – CCD

Số liệu sau khi được xử lý bằng phần mềm Design expert® 7.0.0, ta thu được giá trị hàm đáp ứng theo thực nghiệm và tiên đoán theo mô hình. Nồng độ vi khuẩn gây bệnh có thể được tiên đoán từ phương trình hồi quy sau:

$$\hat{Y} = 7,73 + 0,15x_1 + 0,27x_2 + 0,11x_3 - 0,43x_2x_3 - 0,24x_1^2 - 0,35x_3^2$$

Trong đó, Y là nồng độ *S. aureus* (Log (CFU/ml)); x1, x2, x3 lần lượt là tỷ lệ CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (mg/ml), Glycerol (% v/v) và pH. Hệ số hồi quy (R<sup>2</sup>) tính được là 0,9195.

Phần mềm đưa ra 28 giải pháp tối ưu, trong đó chúng tôi đã lựa chọn công thức tối ưu nhất và thể hiện trên biểu đồ 3D về đáp ứng bề mặt RSM-CCD.



Hình 1. Mặt đáp ứng nồng độ *Staphylococcus aureus* theo tỷ lệ Glycerol và pH

Tương tự đối với chủng *P. aeruginosa* và mẫu đờm (đánh giá trên từng cặp vi khuẩn: *Acinetobacter baumannii* + *Streptococcus mitis* và *P. aeruginosa* + *Streptococcus mitis*), tiến hành các thí nghiệm sàng lọc và tối ưu hóa như phương pháp đã thực hiện đối với mẫu mủ nêu trên, chúng tôi đã xác định được các yếu tố tối ưu tương ứng với hàm lượng như sau:

Bảng 8. Kết quả tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đối với mẫu mủ, đờm với các chủng vi khuẩn

Loại mẫu và vi khuẩn	Yếu tố ảnh hưởng	Giá trị tối ưu
Mẫu Mủ ( <i>S. aureus</i> )	Glycerol	8,39 % v/v
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1 mg/ml
	pH	6,77
Mẫu Mủ ( <i>P. aeruginosa</i> )	NaCl	7,2 mg/ml
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,15 mg/ml
	MgCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,61 mg/ml
Mẫu Đờm ( <i>Acinetobacter baumannii</i> + <i>Streptococcus mitis</i> )	Sodium glycerophosphate	13,6 mg/ml
	Glycerol	10,9 % v/v
	pH	7,5
Mẫu Đờm ( <i>P. aeruginosa</i> + <i>Streptococcus mitis</i> )	Sodium thioglycolate	1,8 mg/ml
	Sodium glycerophosphate	7,0 mg/ml
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 mg/ml

### KẾT LUẬN,

Qua nghiên cứu, chúng tôi đã tối ưu hóa và xác định được hàm lượng, thành phần các yếu tố tham gia vào môi trường cơ chất tạo mẫu bệnh phẩm giả

định mủ và đờm ứng với các chủng vi khuẩn gây bệnh và thường trú gồm: mẫu mủ (*S.aureus*, *P. aeruginosa*), mẫu đờm (*Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, với vi khuẩn thường trú *Streptococcus*

*mitis*), cố định các yếu tố nhiệt độ, thời gian bảo quản đáp ứng yêu cầu của mẫu dùng cho ngoại kiểm. Từ đó xác định các điều kiện tối ưu để áp dụng cho sản xuất hai loại mẫu bệnh phẩm giả định nêu trên.

#### **KIẾN NGHỊ**

- Áp dụng kết quả tối ưu để sản xuất hai loại mẫu bệnh phẩm giả định mũ và đờm ở quy mô phòng thí nghiệm. Nghiên cứu sản xuất ở quy mô lớn hơn.

- Đánh giá độ đồng nhất và độ ổn định ở thời gian dài hơn để xác định thời gian tuổi thọ cao nhất của mẫu.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO:**

1. Nguyễn Cảnh (1993), *Qui hoạch thực nghiệm*, Trường Đại học Bách khoa TP. Hồ Chí Minh.
2. Trần Hữu Tâm, Lê Thị Thùy Như, Lê Tất Châu, Nguyễn Đàm Châu Bảo (2012), *Ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm*, Nhà xuất bản Y học, TP.HCM.
3. Trần Hữu Tâm, Trương Quân Thụy, Lê Trung Phương, Đỗ T. M. Anh và cs. (2013), "Khảo sát bệnh

phẩm và vi khuẩn gây bệnh thường gặp tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng", *Tạp chí Y học Thực hành*, số 867, tr.147-150.

4. Enrique Del Castillo (2007), *Process optimization: a statistical approach*, Springer.

5. Jozef Vandepitte, Kraesten Engbaek, P. Rohner, Peter Piot, Claus C. Heuck (2003), *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*, World Health Organization, Geneva.

6. Robin L. Plackett, J. Peter Burman (1946), "The design of optimum multifactorial experiments", *Biometrika*, 33 (4), 305-325.

7. T. P. Whitehead, F. P. Woodford (1981), "External quality assessment of clinical laboratories in the United Kingdom", *Journal of clinical pathology*, 34 (9), 947-57.

8. World Health Organization (2007), *Policy and procedures of the WHO/NICD Microbiology External Quality Assessment Programme in Africa*, Geneva.