

24 tuần số lượng tiểu cầu giảm 8 G/L (4,3%), trong nghiên cứu của Gayam V. và cộng sự số lượng tiểu cầu giảm 8%.

Sự cải thiện số lượng tiểu cầu sau khi điều trị DAA còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như mức thrombopoietin ban đầu theo nghiên cứu của Chen Y. C.[3]; gan nhiễm mỡ trung bình hoặc nặng có liên quan đáng kể đến việc cải thiện số lượng tiểu cầu theo nghiên cứu của Chen Y. C. [5]; sự thay đổi số lượng tiểu cầu sau khi đạt SVR có liên quan đến sự thay đổi thể tích gan trong nghiên cứu của Seko Y. [8].

## V. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, số lượng tiểu cầu tổng thể đã tăng lên đáng kể ở bệnh nhân nhiễm HCV được điều trị bằng DAA. Cả 4 phác đồ DAA đều giúp số lượng tiểu cầu được cải thiện sớm sau 4 tuần điều trị và mức tăng này vẫn tiếp tục sau 12 tuần điều trị. Phác đồ grazoprevir/elbasvir, sofosbuvir/daclatasvir, sofosbuvir/ledipasvir vẫn giữ được mức tăng số lượng tiểu cầu sau khi đạt SVR. Phác đồ sofosbuvir/velpatasvir có số lượng tiểu cầu giảm sau khi đạt SVR, nguyên nhân giảm cần được nghiên cứu thêm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bộ Y Tế**, Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị viêm gan virus C (Ban hành kèm theo Quyết định số 5012/QĐ-BYT ngày 20/09/2016 của Bộ trưởng Bộ Y tế). 2016
2. **Hoofnagle J. H. (1997)**. Hepatitis C: the clinical

spectrum of disease. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 26(3 Suppl 1), pp. 15S–20S.

3. **Chen Y. C., Ko P. H., Lee C. C., Tseng C. W., & Tseng K. C. (2021)**. Baseline thrombopoietin level is associated with platelet count improvement in thrombocytopenic chronic hepatitis C patients after successful direct-acting antiviral agent therapy. *BMC gastroenterology*, 21(1), 30.
4. **Gayam V., Mandal A. K., Khalid M., Mukhtar O., Gill A., Garlapati P., Khalid M., & Mansour M. (2018)**. Sofosbuvir Based Regimens in the Treatment of Chronic Hepatitis C with Compensated Liver Cirrhosis in Community Care Setting. *International journal of hepatology*. 2018. 4136253.
5. **Chen Y. C., Tseng C. W., & Tseng K. C. (2020)**. Rapid platelet count improvement in chronic hepatitis C patients with thrombocytopenia receiving direct-acting antiviral agents. *Medicine*, 99(19), e20156.
6. **Lý Thị Kim Dung**. Khảo sát tình hình sử dụng và hiệu quả điều trị viêm gan siêu vi C mạn của thuốc kháng virus trực tiếp tại bệnh viện Đại học Y Dược TP. HCM. Luận văn thạc sĩ dược học, Trường Đại Học Y Dược TP. HCM. 2017.
7. **Alcazer V., Mialhes P., Ramière C., Charre C. & Cotte L. (2018)**. Early sofosbuvir-ledipasvir treatment for acute HCV infection induced severe immune thrombocytopenia - a case report. *BMC infectious diseases*. 18(1), 682.
8. **Seko Y., Moriuchi M., Takahashi A., Okishio S., Kataoka S., Okuda K., Mizuno N., Takemura M., Taketani H., Umemura A., Nishikawa T., Yamauchi K., & Itoh Y. (2020)**. The Association between the Platelet Count and Liver Volume in Compensated Cirrhosis Patients after the Eradication of Hepatitis C virus by Direct-acting Antivirals. *Internal medicine* (Tokyo, Japan), 59(15), 1811–1817.

## THIẾT LẬP MẪU MÁU GIẢ ĐỊNH CHỨA VI KHUẨN STAPHYLOCOCCUS AUREUS DÙNG TRONG NGOẠI KIỂM

Hà Mạnh Tuấn\*, Nguyễn Thị Thu Diễm\*\*

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Thiết lập mẫu máu giả định chứa *S. aureus* sử dụng cho chương trình ngoại kiểm chất lượng vi sinh đạt độ đồng nhất và ổn định theo ISO 17043:2011. **Phương pháp:** Nghiên cứu thực nghiệm. Đánh giá tốc độ tăng trưởng của và *S. aureus* trong môi trường máu giả định có và không có acid boric và natrifomat. Xác định nồng độ acid boric và

natrifomat phù hợp. Thử nghiệm sản xuất bộ mẫu máu giả định chứa cơ chất nutrient broth, máu cừu, acid boric và natrifomat theo nồng độ đã xác định. Sử dụng phép kiểm T-Student và One-way ANOVA đánh giá tính đồng nhất, tính ổn định bộ mẫu máu giả định đã sản xuất. **Kết quả:** Sử dụng acid boric và natrifomat duy trì nồng độ *S. aureus* trong mẫu (máu cừu, nutrient broth) hiệu quả hơn so với không sử dụng. Nồng độ acid boric 8% và natrifomat 4% là phù hợp với sản xuất mẫu máu giả định vi khuẩn đích là *S.aureus*. Bộ mẫu sản xuất chứa vi khuẩn đích *S. aureus* đạt tính đồng nhất với  $F_{thực nghiệm} = 0,911 < F_{lý thuyết} = 3,02$ , ổn định trong 17 ngày. **Kết luận:** Qua nghiên cứu, sử dụng acid boric- natrifomat làm chất bảo quản trong môi trường máu giả định là phù hợp. Thiết lập thành công bộ mẫu máu giả định *S. aureus* sử dụng cho chương trình ngoại kiểm vi sinh theo tiêu

\*Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh

\*\*Bệnh viện Truyền máu Huyết học Tp. Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Hà Mạnh Tuấn

Email: hamanhtuan@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 5.01.2021

Ngày phản biện khoa học: 24.2.2021

Ngày duyệt bài: 5.3.2021

chuẩn ISO 17043:2011 đạt tính đồng nhất và tính ổn định trong 17 ngày ở 22°C-30°C.

**Từ khóa:** cấy máu; ngoại kiểm; S.aureus

## SUMMARY

### ESTABLISHING A SIMULATED BLOOD SAMPLE CONTAINING STAPHYLOCOCCUS AUREUS FOR EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT

**Objective:** Establish a simulated blood sample containing *S. aureus* achieving the homogeneity and stability in accordance with ISO 17043: 2011 used for the external quality assessment program. **Methods:** Experimental study was carried out on simulated blood samples containing *S.aureus*. The growth rate of *S. aureus* in simulated blood samples with and without boric acid and natriformat was evaluated. Determine suitable concentrations of acid boric and natriformat. One batch of simulated blood samples containing *S.aureus* with nutrient broth, sheep blood, boric acid and natriformat in the determined concentration has been prepared. The homogeneity and stability of final samples were evaluated by F test and T-student. **Results:** The study found that the use of boric acid and natriformat maintaining the volume of *S. aureus* in samples (sheep's blood, nutrient broth) was more effectively than not using. Concentrations of boric acid 8% and natriformat 4% are suitable for the production of simulated blood samples with the target bacteria *S.aureus*. Sample set containing target bacteria *S. aureus* was homogeneous with  $F_{\text{reality}} = 0.911 < F_{\text{theory}} = 3.02$  and stable for 17 days. **Conclusion:** the use of boric acid and natriformat as a preservative in simulated blood sample is appropriate. Successfully establishing the simulated blood sample set containing *S. aureus* according to ISO 17043: 2011 standards achieves homogeneity and stability in 17 days under the assumed transport conditions of 22°C-30°C.

**Keywords:** blood culture; external quality assessment; *S.aureus*

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm khuẩn huyết là bệnh nghiêm trọng với tỷ lệ tử vong cao, tiên lượng của bệnh phụ thuộc nhiều vào việc chẩn đoán sớm và đúng tác nhân gây bệnh. Cấy máu là xét nghiệm chính để giúp chẩn đoán xác định và nguyên nhân của nhiễm khuẩn huyết. Tuy nhiên không phải các trường hợp nào nhiễm khuẩn huyết đều có kết quả cấy máu, điều này phụ thuộc nhiều yếu tố trong đó chất lượng của xét nghiệm cấy máu đóng vai trò quan trọng. Để đảm bảo chất lượng của xét nghiệm nói chung và xét nghiệm cấy máu nói riêng cần phải có ngoại kiểm đánh giá chất lượng của xét nghiệm. Việc tiến hành ngoại kiểm chất lượng cấy máu cần phải có mẫu máu giả định. Trên thế giới đã có quy trình và công nghệ sản xuất mẫu máu giả định dùng cho ngoại kiểm, tuy nhiên hiện nay giá thành cao và chưa được thử nghiệm áp dụng tại Việt Nam. Nghiên

cứu này nhằm thiết lập được mẫu máu giả định đạt được tính đồng nhất đạt tính đồng nhất, tính ổn định theo tiêu chuẩn ISO 17043:2011 để có thể ứng dụng trong ngoại kiểm.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm

**Đối tượng nghiên cứu:** Quy trình sản xuất thử nghiệm mẫu máu giả định với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* thuần (ATCC) và môi trường lưu trữ vi khuẩn. Cơ chất nền bao gồm: hóa chất Acid boric và Natriformat, môi trường dinh dưỡng nutrient broth, chế phẩm máu cừu.

**Tiêu chuẩn chọn mẫu:** Mẫu máu cừu vô khuẩn, bảo quản ở 2- 6°C không bị tiêu huyết. Các chủng vi khuẩn đưa vào thử nghiệm theo tiêu chuẩn của Mỹ (*S. aureus* 25923). Môi trường cơ chất sử dụng đảm bảo vô khuẩn.

**Cỡ mẫu:** Theo quy định về kiểm tra tính đồng nhất và độ ổn định của mẫu của TCVN 9596 : 2013 cỡ mẫu tối thiểu là 46.

**Nội dung nghiên cứu:** gồm 4 bước

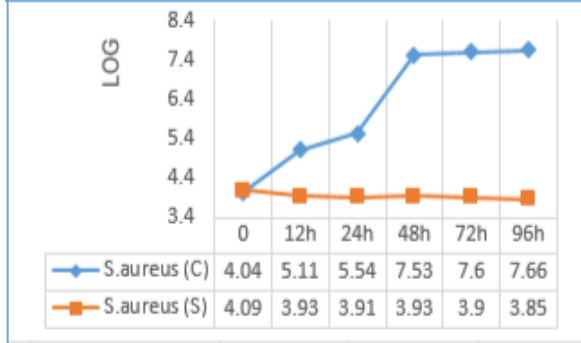
1) Thử nghiệm khả năng duy trì nồng độ vi khuẩn của Acid boric-Natri trong môi trường nutrient broth, máu cừu 10%; 2) Xác định nồng độ Acid boric-Natri formate phù hợp cho mục đích nghiên cứu sản xuất thử nghiệm mẫu máu giả định chứa tác nhân đích là *S. aureus*; 3) Sản xuất thử nghiệm bộ mẫu máu giả định; 4) Đánh giá tính đồng nhất và độ ổn định tiến hành như sau:

Độ đồng nhất: Tiến hành lựa chọn ngẫu nhiên 10 mẫu từ bộ mẫu, mỗi mẫu được đánh giá lặp lại 2 lần (2 kỹ thuật viên khác nhau). Các mẫu được đánh giá tính đồng nhất dựa trên kết quả cấy, đếm số khuẩn khuẩn trên thạch xác định hàm lượng vi khuẩn CFU/mL trong mỗi bộ mẫu. Sử dụng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố Oneway ANOVA để đánh giá độ đồng nhất trên các mẫu bằng phần mềm Microsoft excel.

Độ ổn định: Các thời điểm sẽ được đánh giá tại ngày 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 tại điều kiện nhiệt độ vận chuyển giả định 22°C-30°C. Chọn ngẫu nhiên 3 mẫu từ bộ mẫu đánh giá tại các thời điểm thực hiện kiểm tra độ ổn định. Mẫu được đánh giá độ ổn định dựa trên kết quả định danh vi khuẩn bằng bộ Kit API 20, xác định hàm lượng vi khuẩn CFU/mL trong mỗi mẫu. Sử dụng phần mềm Excel và phép kiểm định t-student với độ tin cậy (CI =95%) xác định chênh lệch giữa giá trị trung bình  $\log_{10}$  CFU/mL của mẫu tại thời điểm ban đầu và thời điểm phân tích để đánh giá độ ổn định.

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**3.1 Tốc độ tăng trưởng của S. aureus giữa 2 nhóm ống (C- Control) và (S- Sample)**



**Hình 1:** Nghiên cứu in vitro về sự khác biệt tăng trưởng S. aureus giữa hai nhóm ống (C) và (S)

được biểu thị bằng Log<sub>10</sub> CFU/mL.

Tốc độ sinh trưởng S. aureus trong nhóm ống có sự tăng vọt rõ rệt, tăng hơn 1 Log<sub>10</sub> CFU/mL sau 12 giờ nuôi cấy và tăng mạnh trên 3 Log<sub>10</sub> CFU/mL sau 48 giờ (CV=24,9%, SD=1,56). Tuy nhiên với nhóm ống tốc độ tăng trưởng của S. aureus lại ghi nhận sự giảm nồng độ vi khuẩn không đáng kể 0,16 Log<sub>10</sub> CFU/mL sau 12 giờ và 0,24 Log<sub>10</sub> CFU/mL cho đến thời điểm 96 giờ, (CV=2,1%, SD=0,081) (hình 1). Nồng độ Acid boric (8%) / Natri formate NF (4%) có khả năng kiểm soát, duy trì nồng độ S. aureus trong môi trường nutrient broth, máu cừu 10% là tốt nhất (bảng 1). (CV: coefficient of variance; SD: standard variation).

**Bảng 1. Tốc độ tăng trưởng S. aureus ở mỗi nồng độ AB-NF biểu thị bằng Log<sub>10</sub> CFU/mL**

Thời điểm	Nồng độ Acid boric / Natri formate							
	6,0% / 3,0%	8,0% / 4,0%	9,5% / 4,5%	10,0% / 5,0%	12,0% / 6,0%	14,0% / 7,0%	16,0% / 8,0%	18,0% / 9,0%
T <sub>0</sub>	4,238	4,238	4,238	4,238	4,238	4,238	4,238	4,238
T <sub>1</sub>	4,354	4,212	4,102	4,064	4,002	3,959	3,932	3,857
T <sub>3</sub>	4,365	4,211	4,099	4,057	4,004	3,957	3,906	3,848
T <sub>5</sub>	4,372	4,185	4,076	4,045	3,996	3,949	3,908	3,860
T <sub>7</sub>	4,364	4,187	4,068	4,037	3,998	3,959	3,898	3,851
T <sub>9</sub>	4,359	4,212	4,081	4,037	4,013	3,950	3,908	3,842
T <sub>11</sub>	4,367	4,217	4,090	4,066	4,033	3,934	3,892	3,866
T <sub>13</sub>	4,390	4,228	4,073	4,057	4,021	3,944	3,908	3,851
T <sub>15</sub>	4,386	4,193	4,061	4,037	4,000	3,932	3,900	3,836
SD	0,045	0,018	0,054	0,064	0,077	0,097	0,111	0,129
X <sub>TB</sub>	4,355	4,209	4,099	4,071	4,034	3,980	3,943	3,894
CV%	1,043	0,429	1,318	1,566	1,921	2,442	2,816	3,317

**3.2 Đánh giá độ ổn định và tính đồng nhất của bộ mẫu**  
- Độ đồng nhất

**Bảng 2. Đánh giá tính đồng nhất lô mẫu S.aureus**

Ống mẫu	Lần 1	Lần 2	X <sub>TB</sub>	Độ lệch
1	4,34	4,32	4,33	0,01
2	4,04	4,30	4,17	0,18
3	4,36	4,04	4,20	0,02
4	4,28	4,20	4,24	0,06
5	4,11	4,30	4,21	0,13
6	4,11	4,28	4,20	0,12

7	4,38	4,38	4,38	0,00
8	4,15	4,32	4,24	0,12
9	4,32	4,15	4,24	0,12
10	4,47	4,36	4,42	0,08

Phân tích 10 mẫu ngẫu nhiên được chọn trong lô mẫu. Định danh bằng Api 100% có kết quả là S. aureus, không có ngoại nhiễm. Đo nồng độ vi khuẩn của 10 mẫu với kiểm định One-way Anova có F thực nghiệm=0,911 < F lý thuyết =3,02 như vậy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu của bộ mẫu (p= 0,55) (bảng 2).

- Độ ổn định

**Bảng 3. Kết quả phân tích độ ổn định của bộ mẫu S. aureus**

	Thời điểm												
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>9</sub>	T <sub>11</sub>	T <sub>13</sub>	T <sub>15</sub>	T <sub>17</sub>	T <sub>19</sub>	T <sub>21</sub>	T <sub>23</sub>
X <sub>TB</sub>	4,26	4,18	4,18	4,21	4,19	4,20	4,19	4,21	4,22	4,19	4,17	4,11	4,08
SD	0,08	0,08	0,06	0,05	0,10	0,08	0,13	0,10	0,05	0,05	0,06	0,05	0,08
T lý thuyết	2,14												

<b>T thực nghiệm</b>	2,08	2,11	1,45	1,66	1,54	1,42	1,09	1,19	1,99	2,44	4,08	4,35
<b>P (2 - tails)</b>	0,06	0,05	0,17	0,12	0,15	0,18	0,29	0,25	0,07	0,03	0,00	0,00

Các giá trị tại thời điểm T1 đến T17 đều có  $T_{\text{thực nghiệm}} < T_{\text{lý thuyết}} = 2,14$  ( $p > 0,05$ ). Từ ngày thứ 19 trở về sau, các thông số T thực nghiệm đều lớn hơn 2,14 và giá trị p (2-tail) đều nhỏ hơn 0,05, nhỏ dần về 0 (bảng 3). Các mẫu máu giả định trong bộ mẫu chứa tác nhân *S. aureus* ổn định đến ngày 17 ở nhiệt độ 20,5°C-29,5°C.

#### IV. BÀN LUẬN

Đối với mẫu ngoại kiểm vi sinh, một trong những yêu cầu quan trọng là mẫu phải duy trì được nồng độ vi khuẩn đích trong mẫu 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. Tổ chức Y tế thế giới hướng dẫn sử dụng acid boric (AB) và natrifomat (NF) làm chất bảo quản (duy trì nồng độ vi khuẩn) trong dạng mẫu giả định chứa tác nhân đích thuộc nhóm vi khuẩn dễ sinh trưởng. Đối với *S. aureus*, trong nhóm ống (C) có sự tăng vọt, tăng đều qua các thời điểm đánh giá, đến sau 48 giờ thì đã tăng trên 3 Log<sub>10</sub>CFU/mL so với nồng độ ban đầu; trong khi ở nhóm (S) ghi nhận nồng độ vi khuẩn của *S. aureus* đã giảm 0,2 Log<sub>10</sub>CFU/mL ngay tại thời điểm 12 giờ thử nghiệm. Như vậy, sự khác biệt rõ giữa có sử dụng AB-NF và không sử dụng AB-NF trong môi trường máu giả định tác động lên tốc độ sinh trưởng của *S. aureus* có ý nghĩa thống kê ( $p=0,0046$ ). Điều này chứng tỏ hợp chất AB-NF đã hạn chế sự tăng trưởng quá mức đối với chủng *S. aureus* trong môi trường cơ chất nền mẫu máu giả định hiệu quả.

Nghiên cứu này ghi nhận tốc độ sinh trưởng *S. aureus* rất nhạy với nồng độ AB-NF khi tăng hàm lượng sử dụng qua mức AB (8%)-NF (4%). Điều này thể hiện rõ khi số lượng vi khuẩn *S. aureus* giảm rõ rệt trong thời gian thử nghiệm so với nồng độ vi khuẩn *S. aureus* tại thời điểm ban đầu. Riêng tại mức AB (8%)-NF (4%) có tác dụng ổn định nồng độ vi khuẩn *S. aureus* tốt nhất trong môi trường máu giả định qua 15 ngày với SD= 0,018, CV% =0,004. Như vậy nồng độ AB-NF phù hợp mục đích sản xuất thử nghiệm mẫu máu giả định chứa tác nhân *S. aureus* trong môi trường máu cừu 10%, nutrient broth lần lượt là AB (8%) và NF (4%) với vi khuẩn *S. aureus*.

Trong nghiên cứu này để đánh giá độ đồng nhất cho mẫu ngoại kiểm chúng tôi dùng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố, đã cho thấy không có sự khác biệt về nồng độ vi khuẩn CFU/mL giữa các ống mẫu trong cùng bộ mẫu khi có giá trị  $F_{\text{thực nghiệm}} < F_{\text{lý thuyết}}$  ( $p > 0,05$ ). Với kết quả phân tích đồng nhất của bộ mẫu *S. aureus* (bảng 2) chúng tôi kết luận rằng cả bộ mẫu máu giả định chứa vi khuẩn *S. aureus* đạt

đồng nhất theo tiêu chuẩn đánh giá chất lượng mẫu ngoại kiểm theo ISO 17043:2011, đảm bảo cho việc đánh giá chất lượng các phòng xét nghiệm tham gia chương trình ngoại kiểm được khách quan.

Khi tiến hành thực hiện kiểm định T-test phân tích sự chênh lệch nồng độ Log<sub>10</sub> CFU/mL của mẫu tại từng thời điểm đánh giá với giá trị Log<sub>10</sub> CFU/mL tại thời điểm đánh giá đồng nhất. Nếu tại thời điểm đánh giá nhận giá trị  $T_{\text{thực nghiệm}} < T_{\text{lý thuyết}}$  ( $p > 0,05$ ) chứng tỏ bộ mẫu đạt ổn định đến tại thời điểm đó. Từ kết quả phân tích được sau thử nghiệm thì bộ mẫu *S. aureus* ổn định trong 17 ngày tại điều kiện nhiệt độ từ 20,5°C-29,5°C (bảng 3). Như vậy bộ mẫu đã sản xuất trong nghiên cứu này đã hoàn toàn đáp ứng được về yếu tố thời gian cho mẫu ngoại kiểm vi sinh.

#### V. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu chúng tôi đã thiết lập được bộ mẫu máu giả định *S. aureus* dùng cho ngoại kiểm xét nghiệm cấy máu. Bộ mẫu máu giả định có sử dụng acid boric và natri formate làm chất bảo quản với nồng độ là 8% / 4%. Bộ mẫu máu giả định chứa vi khuẩn đích *S. aureus* đạt được sự ổn định và đồng nhất có thể dùng trong ngoại kiểm vi sinh theo tiêu chuẩn ISO 17043:2011.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y Tế (2017)**. Hướng dẫn thực hành kỹ thuật vi sinh lâm sàng. Nhà xuất bản y học Hà Nội.
- ISO/IEC 17043:2011 (2011)**. Conformity assessment- General requirement for proficiency testing. International Organization for Standardization, First edition.
- Tiêu Chuẩn Quốc Gia (TCVN) 9596:2013 ISO Guide 13528:2003 (2013)**. Phương pháp thống kê dùng trong thử nghiệm thành thạo bằng so sánh liên phòng thí nghiệm, tr.56-61.
- Kirn TJ, Weinstein MP (2013)**. "Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret". Clin Microbiol Infect, 19(6):513-520.
- Vernelen K (2017)**. Use of simulated samples in the EQA Microbiology. Commission de Biologie Clinique, <https://www.wiv-isp.be/qml/symposia/26-03-09/3-2-Use-of-simulated-samples-EQA-microbiology-KV.pdf>.
- World Health Organization (WHO) (2016)**. WHO manual for organizing a national external quality assessment programme for health laboratories and other testing sites. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.