

**UBND THÀNH PHỐ HÀ NỘI  
TRƯỜNG CAO ĐẲNG Y TẾ HÀ NỘI**

**GIÁO TRÌNH**

*(Ban hành kèm theo Quyết định số: 1107 /QĐ-CDYTN ngày 22 tháng 11 năm  
2021 của Trường Cao đẳng Y tế Hà Nội)*

**MÔ ĐUN: VI SINH NÂNG CAO  
NGÀNH: KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM Y HỌC  
TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG**

**Hà Nội, năm 2021**

## **TUYÊN BỐ BẢN QUYỀN**

Tài liệu này thuộc loại sách giáo trình nên các nguồn thông tin có thể được phép dùng nguyên bản hoặc trích dùng cho các mục đích về đào tạo và tham khảo.

Mọi mục đích khác mang tính lệch lạc hoặc sử dụng với mục đích kinh doanh thiếu lành mạnh sẽ bị nghiêm cấm.

## LỜI GIỚI THIỆU

*Vì sinh nâng cao là mô đun chuyên ngành xét nghiệm được thực hiện vào học kỳ 2 năm học thứ 3 trong chương trình đào tạo nghề kỹ thuật xét nghiệm y học trình độ cao đẳng. Về tính chất của mô đun: là mô đun tự chọn, tích hợp lý thuyết và thực hành tại trường.*

*Giáo trình được biên soạn theo chương trình khung đã được phê duyệt cho sinh viên ngành cao đẳng xét nghiệm y học bao gồm 6 bài trong đó có 3 bài lý thuyết và 3 bài thực hành, mỗi bài có mục tiêu học tập và các nội dung thiết yếu. Trong đó, nội dung thể hiện được các yêu cầu: kiến thức cơ bản, chính xác khoa học, cập nhật được tiến bộ khoa học hiện tại và thực tiễn. Sách dùng để đào tạo sinh viên ngành cao đẳng xét nghiệm y học đồng thời cũng là tài liệu tham khảo tốt cho sinh viên các chuyên ngành khác quan tâm đến công tác xét nghiệm.*

*Các tác giả là những người có kinh nghiệm lâm sàng lâu năm cũng như kinh nghiệm giảng dạy, hy vọng rằng cuốn sách sẽ cung cấp những thông tin giá trị cho sinh viên nhằm giúp sinh viên có nền tảng kiến thức, kỹ năng cần thiết.*

*Các tác giả đã biên soạn cuốn giáo trình này với tinh thần trách nhiệm cao, song cũng không tránh khỏi những thiếu sót và cần bổ sung. Chúng tôi mong nhận được nhiều ý kiến đóng góp của độc giả và đồng nghiệp để cuốn giáo trình này càng hoàn thiện hơn.*

*Xin trân trọng cảm ơn!*

....., ngày.....tháng.....năm.....

**CÁC TÁC GIẢ**

**Tham gia biên soạn**

**1. Chủ biên TS. Bùi Huy Tùng**

2. ThS. Hà Thị Nguyệt Minh

## MỤC LỤC

GIÁO TRÌNH VI SINH NÂNG CAO .....	6
PHẦN LÝ THUYẾT.....	8
BÀI 1. KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ ĐỊNH LƯỢNG.....	8
BÀI 2. KỸ THUẬT LƯU GIỮ CHỦNG VI KHUẨN.....	12
BÀI 3. CÁC KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH VI KHUẨN KHÁNG THUỐC.....	17
PHẦN THỰC HÀNH .....	25
BÀI 4. THỰC HÀNH KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ ĐỊNH LƯỢNG.....	25
BÀI 5. THỰC HÀNH KỸ THUẬT LƯU GIỮ CHỦNG VI KHUẨN .....	32
BÀI 6. THỰC HÀNH KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH VI KHUẨN KHÁNG THUỐC ..	38
HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG GIÁO TRÌNH .....	52
TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	53

# GIÁO TRÌNH VI SINH NÂNG CAO

**Tên mô đun: VI SINH NÂNG CAO**

**Mã mô đun: XN15A**

**Vị trí, tính chất, ý nghĩa và vai trò của môn học/mô đun:**

- Vị trí: là mô đun chuyên ngành xét nghiệm được thực hiện vào học kỳ 2 năm học thứ 3 trong chương trình đào tạo nghề kỹ thuật xét nghiệm y học trình độ cao đẳng.
- Tính chất: là mô đun tự chọn, tích hợp lý thuyết và thực hành tại trường.

**Mục tiêu của môn học/mô đun:**

**\* Về kiến thức:**

- Trình bày được nguyên lý, thực hiện được kỹ thuật và nhận định được kết quả của kháng sinh đồ theo nồng độ ức chế vi khuẩn của 1 số vi khuẩn gây bệnh thường gặp.
- Mô tả được nguyên lý, các bước tiến hành và nhận định kết quả của 1 số kỹ thuật chẩn đoán virus mới nổi bằng test nhanh.

**\* Về kỹ năng:**

- Thực hiện được quy trình lưu giữ chủng vi khuẩn.
- Thực hiện đúng thao tác vô trùng, quy trình khử trùng, tiệt trùng trong phòng xét nghiệm vi sinh

**\* Về năng lực tự chủ và trách nhiệm:**

- Biểu lộ tác phong cẩn thận, tỉ mỉ, chính xác, trung thực trong khi thực hiện xét nghiệm.
- Thể hiện hành vi đúng mực với bệnh nhân, đồng nghiệp và có ý thức bảo vệ môi trường cho cộng đồng

**Nội dung và phương pháp đánh giá MH/MĐ**

## 1. Nội dung

TT	Tên chương/bài	Thời gian (giờ)			
		TS	LT	TH	KT
1	Kỹ thuật kháng sinh đồ định lượng	5	5		
2	Kỹ thuật lưu giữ chủng vi khuẩn	5	5		
3	Các kỹ thuật xác định vi khuẩn kháng thuốc	4	4		
	Kiểm tra	1			1
4	Thực hành kỹ thuật kháng sinh đồ định lượng	15		15	
5	Thực hành kỹ thuật lưu giữ chủng vi	9		9	

	khuẩn				
	Kiểm tra	1			1
6	Thực hành kỹ thuật xác định vi khuẩn kháng thuốc	5		5	
	<b>Tổng số</b>	<b>45</b>	<b>14</b>	<b>29</b>	<b>2</b>

## 2. Phương pháp

- Kiến thức: kiểm tra nội dung đã học bằng bộ công cụ lượng giá.
- Kỹ năng: Kiểm tra thực hành tại phòng thực hành chuyên dụng, sử dụng thang điểm.
- Năng lực tự chủ, trách nhiệm (thái độ): đánh giá thái độ thông qua việc sinh viên thực hiện kỹ năng.

Nội dung	Hệ số 1	Hệ số 2	Thi
LT	x		x
TH		x	
Hình thức	Tự luận/ Trắc nghiệm/ chuyên cần	Thực hành	Thực hành
Số lượng	1	1	1

## PHẦN LÝ THUYẾT

### BÀI 1. KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ ĐỊNH LƯỢNG

#### MỤC TIÊU

##### \* Kiến thức:

1. Trình bày được nguyên lý và ý nghĩa của kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)
2. Trình bày được dụng cụ hóa chất để thực hiện kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)
3. Mô tả được quy trình kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trên môi trường đặc, môi trường lỏng.

##### \* Kỹ năng:

4. Nhận định được kết quả của xác định nồng độ ức chế tối thiểu trên môi trường đặc và môi trường lỏng dựa trên một số xét nghiệm lâm sàng

##### \* Năng lực tự chủ và trách nhiệm:

5. Nghiêm túc, cẩn thận, sáng tạo trong việc vận dụng kiến thức được học để giải quyết vấn đề trong học tập

#### NỘI DUNG

##### 1. Nguyên lý kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Kháng sinh được hoà đều trong môi trường lỏng hoặc môi trường đặc nên tại bất kỳ điểm nào trong môi trường, nồng độ kháng sinh đều như nhau. Kháng sinh được pha loãng thành nhiều nồng độ khác nhau (thường là pha loãng theo cấp số nhân). Một lượng vi khuẩn nhất định như nhau được cấy vào môi trường có nồng độ kháng sinh khác nhau. Ở nồng độ kháng sinh nào còn thấy vi khuẩn phát triển là vi khuẩn có khả năng đề kháng với kháng sinh tại nồng độ đó. Nồng độ kháng sinh pha loãng nhất có khả năng ức chế được sự phát triển của vi khuẩn được gọi là nồng độ ức chế tối thiểu. Giá trị MIC cho biết nồng độ kháng sinh cần đạt được tại ổ nhiễm trùng để có thể ức chế được căn nguyên gây bệnh. Tuy nhiên, giá trị MIC không phải là một giá trị tuyệt đối. Giá trị MIC thực có khi nằm giữa nồng độ ức chế tối thiểu có được khi đọc kết quả thử nghiệm và nồng độ kháng sinh thấp hơn ngay sát giá trị của MIC đọc kết quả. Ví dụ, khi pha loãng kháng sinh theo cấp số nhân bậc hai, thử nghiệm xác định MIC cho giá trị là 16 µg/ml nhưng giá trị MIC thực có thể nằm trong khoảng giữa của 16 µg/ml và 8 µg/ml. Dựa vào giá trị MIC và điểm gãy trong bảng chuẩn, mức độ nhạy cảm có thể phân chia thành phân loại S (susceptible - nhạy cảm), I (intermediate - trung gian), R (resistant - đề kháng) hoặc NS (non-susceptible - không nhạy cảm).

##### 2. Kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu trên môi trường đặc



## **2.1. Dụng cụ, hóa chất, sinh phẩm**

### 2.1.1. Vật liệu

- Thạch đĩa Muller Hinton.
- Nước muối sinh lý vô trùng.
- Chủng vi khuẩn thuần, mới 16-24 giờ.

### 2.1.2. Dụng cụ

- Panh kẹp, kéo
- Đèn cồn
- Que cấy
- Que tăm bông (que gòn) vô trùng

### 2.1.3. Thiết bị

- Máy lắc.
- Tủ ấm.
- Máy đo độ đục hoặc ống Mc Faland 0,5.

## **2.2. Các bước tiến hành**

- Dùng tăm bông (que gòn) vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn tăm bông (que gòn) trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt phần huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông (que gòn). Sau đó, ria đều que tăm bông (que gòn) trên toàn bộ mặt đĩa thạch Mueller-Hinton, xoay đều đĩa thạch theo góc  $60^\circ$  rồi ria đều que tăm bông (que gòn). Cứ tiếp tục xoay đĩa một góc  $60^\circ$  và ria que tăm bông (que gòn) để sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt đĩa thạch. Cuối cùng, ria tăm bông (que gòn) vòng quanh bờ mép của mặt thạch. Đóng nắp đĩa thạch và để đĩa thạch sau ria cấy vài phút ở nhiệt độ phòng cho mặt thạch se lại. Có thể dùng máy ria vi khuẩn để dàn đều canh khuẩn lên mặt thạch.

- Để mặt thạch se hoàn toàn trước khi đặt dải Etest.
- Đặt dải Etest lên mặt thạch sao cho mặt có ghi dải nồng độ hướng lên trên và phải đảm bảo toàn bộ bề mặt của dải Etest được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch.
- Khi đã đặt xong dải Etest không được dịch chuyển dải Etest khỏi vị trí.
- Ủ ấm đĩa ở  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  trong vòng 16 - 20 giờ ở điều kiện khí trường bình hoặc khí trường có bổ sung  $\text{CO}_2$  nếu chủng vi khuẩn là *H. influenzae*, *Streptococci*, *Neisseria*.

- Đặt 6 dải Etest đặt trên đĩa 150mm, 2 dải Etest đặt trên đĩa 90mm

## **2.3. Nhận định kết quả**

- Sau ủ ấm 16 - 24 giờ và khi thấy rõ vi khuẩn mọc, đọc giá trị MIC ở điểm cắt của hình elip với dải Etest. Không đọc kết quả khi bị lẫn hai hay nhiều chủng vi

khuẩn, khi vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.

- Làm tròn giá trị MIC ở điểm giữa hai bậc pha loãng lên giá trị cao hơn trước khi phiên giải kết quả.

- Phiên giải kết quả MIC ra giá trị S, I hoặc R theo hướng dẫn của CLSI cập nhật hàng năm.

- Với các kháng sinh diệt khuẩn, phải đọc giá trị MIC tại điểm vi khuẩn bị ức chế hoàn toàn. Đặc biệt chú ý khi đọc với chủng Pneumococci, Streptococci, Enterococci, Acinetobacter và Stenotrophomonas spp. Với các kháng sinh kìm khuẩn, phải đọc giá trị MIC tại điểm vi khuẩn bị ức chế 80%.

### **3. Kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu trên môi trường lỏng**

#### **3.1. Dụng cụ, hóa chất, sinh phẩm**

- Tủ âm.
- Máy vortex.
- Canh thang Mueller-Hinton 0,5 ml.
- Kháng sinh bột sử dụng cho nghiên cứu thử nghiệm.
- Độ đục chuẩn McFarland 0,5.
- Nước muối 0,85% vô trùng.
- Đèn cồn, que cấy, ống nghiệm.

#### **3.2. Các bước tiến hành**

- Chuẩn bị đủ số lượng ống canh thang Mueller-Hinton 0,5 ml theo các nồng độ kháng sinh cần thử nghiệm. Thêm một ống canh thang không cấy vi khuẩn và không có kháng sinh để làm chứng vô trùng cho môi trường và một ống canh thang cấy vi khuẩn nhưng không chứa kháng sinh để làm chứng cho sự phát triển của vi khuẩn.

- Hút 0,5 ml dung dịch kháng sinh thử nghiệm chuyển vào ống chứa 0,5 ml canh thang Mueller-Hinton, trộn đều rồi chuyển 0,5 ml hỗn dịch sang ống 0,5 ml canh thang thứ 2, trộn đều rồi tiếp tục chuyển 0,5 ml hỗn dịch sang ống 0,5 ml canh thang thứ 3. Cứ tiếp tục như vậy cho đến ống canh thang cuối cùng thì hút bỏ 0,5 ml hỗn dịch của ống cuối cùng đi. Như vậy, nồng độ kháng sinh trong các ống canh thang được pha loãng giảm dần theo bậc 2.

- Cho vào mỗi ống canh thang chứa kháng sinh 0,5 ml canh khuẩn 10<sup>6</sup> CFU/ml, một ống canh thang chỉ có 0,5 ml canh khuẩn 10<sup>6</sup> CFU/ml và một ống canh thang không bổ sung canh khuẩn. Nồng độ vi khuẩn trong mỗi ống còn 5 x 10<sup>5</sup> CFU/ml.

#### **3.3. Nhận định kết quả**

- Đọc giá trị MIC ở ống có nồng độ kháng sinh thấp nhất còn ức chế được sự phát triển của vi khuẩn (ống canh thang không đục) khi nhìn bằng mắt thường. Chỉ

đọc kết quả khi ống chứa vi khuẩn không chứa kháng sinh thấy canh thang đục và ống chứa canh thang không chứa vi khuẩn phải trong. Khi thử nghiệm các kháng sinh 209 sulfonamide hoặc trimethoprim, có thể thấy vi khuẩn mọc dạng vết rất khó xác định được giá trị MIC. Trong trường hợp như vậy, sẽ đọc MIC ở ống mà vi khuẩn bị ức chế khoảng từ 80% hoặc hơn khi so sánh với ống chứa vi khuẩn. Vi khuẩn mọc có dạng vết cũng gặp ở những trường hợp kháng sinh kìm khuẩn như chloramphenicol và tetracycline.

- Giá trị MIC được so sánh với các giá trị breakpoint trong tài liệu CLSI hoặc EUCAST để nhận định là nhạy cảm (S), đề kháng trung gian (I) hay đề kháng (R).

#### **4. Ý nghĩa của kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu**

- Kỹ thuật kháng sinh đồ pha loãng được coi là phương pháp chuẩn xác định giá trị MIC nhưng kỹ thuật kháng sinh đồ dải giấy khuếch tán theo bậc nồng độ lại là phương pháp khả thi thực hiện tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

- Kỹ thuật vi pha loãng được trình bày dưới đây là phương pháp tiêu chuẩn xác định MIC và cũng có thể thực hiện được tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

#### **LƯỢNG GIÁ**

1. Trình bày nguyên lý và ý nghĩa của kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)?
2. Trình bày dụng cụ hóa chất để thực hiện kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)?
3. Trình bày các bước của kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trên môi trường đặc, môi trường lỏng?

## BÀI 2. KỸ THUẬT LƯU GIỮ CHỦNG VI KHUẨN

### MỤC TIÊU

#### \* Kiến thức:

1. Trình bày được mục đích, ý nghĩa, nguyên tắc của lưu giữ chủng vi khuẩn.
2. Trình bày các yêu cầu, dụng cụ hóa chất cần thiết để lưu giữ chủng vi khuẩn.
3. Mô tả được quy trình lưu giữ chủng vi khuẩn.

#### \* Kỹ năng

4. Nhận định được kết quả lưu giữ chủng vi khuẩn dựa trên một số thử nghiệm lâm sàng?

#### \* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

5. Xây dựng được kỹ năng làm việc độc lập và làm việc nhóm.
6. Nghiêm túc, cẩn thận, sáng tạo trong việc vận dụng kiến thức được học để giải quyết vấn đề trong học tập.

### NỘI DUNG

#### 1. Mục đích, ý nghĩa của lưu giữ chủng vi khuẩn

- Chủng (strain): là chủng vi khuẩn nuôi cấy thuần nhất, được lấy ra từ một khuẩn lạc duy nhất (không lẫn với một khuẩn lạc nào khác). Chủng chuẩn (reference strain): là chủng mang tên loài và là chuẩn vĩnh viễn cho loài này. Một loài bao gồm chủng này và tất cả các chủng tương tự như nó.

- Các chủng vi sinh vật nên được lưu giữ, bảo quản. Đặc biệt với các chủng vi sinh vật nhất là chủng chuẩn, các chủng vi sinh vật cần được duy trì đặc tính sinh học, tính trạng di truyền là rất quan trọng. Các phương pháp bảo quản không thích hợp có thể dẫn đến đột biến hoặc mất plasmid. Do vậy cần phải chọn các phương pháp bảo quản thích hợp cho các chủng chuẩn.

- Chủng chuẩn được lưu giữ, bảo quản đúng giúp cho chủng sống, có quy trình cấy chuyển hợp lý đảm bảo luôn có chủng mới phục vụ cho công việc kiểm tra chất lượng thường xuyên, giảm khả năng biến đổi kiểu hình, kiểu gen của chủng cũng như giảm khả năng tạp nhiễm các vi khuẩn khác.

#### 2. Nguyên tắc lưu giữ chủng vi khuẩn

Các chủng vi sinh vật nên được lưu giữ, bảo quản. Đặc biệt với các chủng vi sinh vật nhất là chủng chuẩn, các chủng vi sinh vật cần được duy trì đặc tính sinh học, tính trạng di truyền là rất quan trọng. Các phương pháp bảo quản không thích hợp có thể dẫn đến đột biến hoặc mất plasmid. Do vậy cần phải chọn các phương pháp bảo quản thích hợp cho các chủng chuẩn. Chủng chuẩn được lưu giữ, bảo quản đúng giúp cho chủng sống, có quy trình cấy chuyển hợp lý đảm bảo luôn có chủng mới phục vụ cho công việc kiểm tra chất lượng thường xuyên, giảm khả

năng biến đổi kiểu hình, kiểu gen của chúng cũng như giảm khả năng tập nhiễm các vi khuẩn khác.

### **3. Yêu cầu của chủng cần lưu giữ**

- Chủng vi khuẩn thuần nhất được phân lập và định danh.
- Chủng vi khuẩn được cấy vào môi trường lưu giữ để đảm bảo duy trì sự sống và giữ được tính chất sinh vật hóa học. Phương pháp lưu giữ chuẩn cần hạn chế tối đa xảy ra đột biến trên chủng vi khuẩn.
- Chủng lưu giữ để phục vụ cho mục đích chẩn đoán, kiểm tra chất lượng, hồi cứu và các nghiên cứu thực nghiệm tiếp theo.

### **4. Dụng cụ, hóa chất**

- Thiết bị:
  - + Tủ an toàn sinh học cấp 2.
  - + Kính hiển vi quang học.
  - + Tủ ẩm.
  - + Tủ lạnh, tủ âm sâu (-80° C).
  - + Máy Vitek Compact (Bio Merieux, Pháp).
  - + Máy đo độ đục.
- Dụng cụ:
  - + Lam kính sạch.
  - + Đèn cồn.
  - + Dầu soi.
  - + Que cấy.
  - + Bút chì kính.
- Hóa chất, thuốc thử:
  - + Bộ thuốc nhuộm Gram:
    - Tím Gentian.
    - Iodine.
    - Cồn 96°.
    - Safranin/ Fuchsin.
    - Các môi trường nuôi cấy: thạch máu, thạch sô cô la, thạch thường...
    - Bộ sinh vật hóa học: API 20E, API 20NE, API 20strep.
    - Thạch Muller – Hinton, dải giấy kháng sinh (E test).
    - Card định danh và card kháng sinh đồ (đi kèm máy Vitek Compact).
    - Các hóa chất khác: khoanh giấy optochin, huyết tương thỏ,..

## 5. Quy trình lưu giữ chủng vi khuẩn

### - Cấy chuyển

+ Xác định môi trường nuôi cấy phù hợp, nhiệt độ giữ chủng tối ưu, thời gian giữa các lần cấy chuyển.

+ Lấy chủng lưu trữ từ tủ lưu trữ ra (thường là tủ có nhiệt độ âm sâu). Dùng que cấy vô trùng lấy chủng (khi ống giữ chủng vẫn còn đông đá trước khi tan băng), cấy vào môi trường thích hợp và để trong điều kiện phù hợp (nhiệt độ, độ ẩm, thời gian).

+ Các chủng sau khi mọc được bảo quản ở nhiệt độ phòng, hoặc ở 2-8 độ C (tùy yêu cầu và mục đích sử dụng) và cấy chuyển hàng tuần. Chuẩn bị chủng làm việc mới ít nhất 1 tháng 1 lần (tùy loại).

+ Cấy chuyển lại theo lịch, mỗi lần cấy chuyển kiểm tra các đặc tính sinh học của chủng vi khuẩn để phát hiện thay đổi hoặc chủng bị nhiễm (nếu có).

+ Chú ý: Trước khi tiến hành các thử nghiệm, cấy chuyển chủng lên đĩa thạch để thu được khuẩn lạc riêng rẽ. Đối với chủng đã đông băng, cấy chuyển chủng 2 lần trước khi tiến hành các thử nghiệm.

### - Giữ chủng trong glycerol ở -20 độ C

+ Dùng 2 ống cryotube có chứa 1-2ml glycerol trung tính vô trùng

+ Nuôi cấy chủng thuần nhất ở môi trường đặc

+ Lấy 1 que cấy khuẩn lạc nghiền vào ống có chứa glycerol

+ Để ở tủ -20 độ C, tránh đông và tan băng nhiều lần

+ Cấy chuyển sau 12-18 tháng

### - Giữ chủng trong dầu khoáng để ở nhiệt độ phòng

+ Tiệt trùng 5ml dầu khoáng trong ống thủy tinh có nắp kín bằng kim loại hoặc các dụng cụ chịu nhiệt khác, ở nhiệt độ 180 độ C trong 2 giờ trong tủ sấy khô.

+ Kiểm tra sự vô trùng của dầu khoáng bằng cách lấy thử dầu ra một số môi trường phù hợp cho các vi khuẩn thông thường như thạch thường hoặc thạch máu.

+ Nuôi cấy vi khuẩn theo phương pháp thông thường để vi khuẩn phát triển đến giai đoạn tăng sinh theo hàm số mũ, sau đó cho dầu khoáng đã tiệt trùng vào phủ kín bề mặt môi trường và dày ít nhất 2cm.

+ Giữ các môi trường ở tư thế đứng trong tủ lạnh, cấy chuyển 6-12 tháng kiểm tra khả năng sống sót của vi khuẩn.

+ Dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn từ môi trường giữ chủng, đặt nhẹ đầu que cấy lên mảnh giấy thấm vô trùng để hút dầu đi, sau đó cấy chuyển như thông thường

### - Cấy xuyên sâu

+ Dùng thạch TSA cho những chủng dễ nuôi cấy như Staphylococci và Enterobacteriaceae, CTA đối với giữ chủng Neisseria và Streptococci

+ Sử dụng những ống có nắp vặn, đáy sâu chứa môi trường thạch phù hợp

+ Dùng que cấy, lấy khuẩn lạc cắm vào ống thạch

+ Ủ qua đêm ở 35 độ C

+ Đậy nắp ống thạch. Nếu dùng ống loại nắp đậy, cần phải bọc paraffin

+ Để ở nhiệt độ phòng, cấy chuyển sau 1 năm với Staphylococci và Enterobacteriaceae

+ Đối với Neisseria giữ ở 35 độ C, cấy chuyển mỗi 2 tuần

+ Streptococci giữ ở nhiệt độ phòng, cấy chuyển hàng tháng

- Môi trường cook-meat giữ chủng vi khuẩn kỵ khí

+ Sử dụng những ống có nắp chứa môi trường

+ Dùng que cấy vô trùng lấy khuẩn lạc đã phân lập nghiền vào môi trường

+ Ủ qua đêm ở 35 độ C

+ Đậy nắp

+ Giữ ở nhiệt độ phòng, cấy chuyển mỗi 2 tháng

- Làm khô

+ Chủ yếu giữ nha bào và một số loại vi khuẩn đặc biệt

+ Làm khô bằng giấy thấm: đặt các khoanh giấy vô trùng vào một đĩa petri vô trùng, thêm huyền dịch vi khuẩn ( $10^8$  tế bào /ml) vào các khoanh giấy cho đến khi khoanh giấy bão hòa. Làm khô khoanh giấy bằng cách hút chân không, sau đó cất các khoanh giấy khô trong tủ lạnh

+ Gelatin: pha canh thang vi khuẩn và gelatin đang nóng chảy (30 độ) sao cho nồng độ vi khuẩn khoảng  $10^8$ -  $10^9$  tế bào /ml. Dùng pipet Pasteur vô trùng hút huyền dịch vi khuẩn nhỏ lên đáy một đĩa petri vô trùng. Đặt đĩa petri bày vào bình hút ẩm chân không. Khi gelatin đã khô, dùng panh vô trùng gấp vào ống vô trùng, nắp kín rồi cất trong tủ lạnh hoặc tủ lạnh sâu.

+ Silica gel: cho các hạt silica gel vào ống nghiệm, tiệt trùng trong lò sấy khô, pha khuẩn lạc vào dung dịch skim milk 10% sau đó cho vào ống chứa silica gel, giữ ở 0 độ C trong khoảng 10 phút. Đặt các ống này vào bình hút ẩm có chứa silica gel khô khác, giữ như vậy ở nhiệt độ phòng trong 1 tuần hoặc ở 25 độ C trong 2 ngày. Cuối cùng, nắp chặt các ống lại và giữ trong bình chống ẩm.

- Đông khô

+ Nguyên tắc: đông khô là quá trình làm mất nước trong huyền dịch vi khuẩn đã đông lạnh bằng cách làm cho chúng bay hơi dưới áp lực âm. Các ttes bào đông khô có thể sống được trong thời gian rất dài nếu không cho chúng tiếp

xúc với oxy, ẩm và ánh sáng. Chúng có thể kays ra dùng bất cứ lúc nào bằng cách hòa vào môi trường phù hợp

+ Sau khi đông khô vi khuẩn, bảo quản ở 2-8 độC tránh ánh sáng có thể giữ được chủng trên 30 năm mà không biến đổi đặc tính của chủng, bảo quản ở nhiệt độ -70,-80 độ C giữ được lâu hơn.

- Siêu lạnh

+ Bảo quản trong nitơ lỏng ở -19 độ C hoặc bảo quản trong pha khí của dung dịch nitrogen

+ Phương pháp này giúp bảo quản chủng trong 10-30 năm.

## **LƯỢNG GIÁ**

1. Trình bày được mục đích, ý nghĩa, nguyên tắc của lưu trữ chủng vi khuẩn?
2. Trình bày các yêu cầu, dụng cụ hóa chất cần thiết để lưu trữ chủng vi khuẩn?
3. Mô tả các quy trình lưu giữ chủng vi khuẩn?



### **BÀI 3. CÁC KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH VI KHUẨN KHÁNG THUỐC**

#### **MỤC TIÊU**

##### **\* Kiến thức:**

1. Trình bày được nguyên lý của kỹ thuật xác định tụ cầu vàng kháng methicillin (MRSA)
2. Trình bày được nguyên lý của kỹ thuật xác định một số trực khuẩn gram âm sinh enzym  $\beta$ - lactamase phổ mở rộng (ESBL)
3. Mô tả được quy trình kỹ thuật xác định MRSA và ESBL.
4. Nhận định được kết quả kỹ thuật.

##### **\* Kỹ năng**

5. Nhận định được kết quả của kỹ thuật MRSA và kỹ thuật ESBL dựa trên một số xét nghiệm lâm sàng.

##### **\* Năng lực tự chủ và trách nhiệm:**

6. Xây dựng được kỹ năng làm việc độc lập và làm việc nhóm.
7. Nghiêm túc, cẩn thận, sáng tạo trong việc vận dụng kiến thức được học để giải quyết vấn đề trong học tập.

#### **NỘI DUNG**

##### **1. Nguyên lý của kỹ thuật xác định tụ cầu vàng kháng Methicillin.**

- Tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) là một cầu khuẩn Gram dương, không có lông, không di động, không sinh nha bào. *S.aureus* tìm thấy trong hệ vi sinh vật cư trú tại màng nhầy mũi ở 20 – 40% dân số nói chung. Khi hàng rào nhầy và da bị tổn thương, ví dụ như các bệnh da mạn tính, vết thương, phẫu thuật, *S.aureus* có thể xâm nhập vào các lớp mô dưới da hoặc máu và gây nhiễm trùng. Người bệnh có các dụng cụ y tế xâm lấn như catheter tĩnh mạch trung tâm và ngoại vi hoặc suy giảm hệ miễn dịch có nguy cơ nhiễm *S.aureus*.

- Methicillin là một penicillin bán tổng hợp bảo vệ vòng betalactam không bị thủy phân bởi penicillinase được giới thiệu vào năm 1959, ngay sau khi được đưa vào sử dụng trên lâm sàng, tụ cầu vàng kháng methicillin (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA) đã được báo cáo. Sự bùng phát của MRSA xảy ra ở châu Âu vào đầu những năm 1960. Do độc tính, hiện nay methicillin không còn được sử dụng cho người và thay vào đó là các penicillin ổn định hơn như oxacillin, flucloxacillin và dicloxacillin. Dù vậy, thuật ngữ tụ cầu vàng kháng methicillin vẫn tiếp tục được sử dụng. Bên cạnh đó, MRSA còn có khả năng kháng nhiều nhóm kháng sinh khác đã trở thành vấn đề lớn.

- MRSA khá phổ biến ở hầu hết các bệnh viện ở châu Á, tỷ lệ MRSA chiếm tới 50% các nhiễm trùng huyết do tụ cầu vàng. Tỷ lệ kháng methicillin cao liên quan

đến tình trạng sử dụng kháng sinh rộng rãi cũng như tình trạng dân số đông là điều kiện thuận lợi để lan truyền nhanh các chủng đề kháng.

- MRSA có thể gây ra nhiều loại nhiễm trùng, như SSTIs, viêm phổi, nhiễm trùng xương khớp, hội chứng sốc nhiễm độc (là một biến chứng hiếm gặp, đe dọa tính mạng) và nhiễm trùng huyết, có thể dẫn đến viêm nội tâm mạc hoặc sốc nhiễm khuẩn.

- Mẫu bệnh phẩm vi sinh liên quan đến MRSA có thể phân làm hai loại: mẫu lâm sàng và mẫu sàng lọc. Mẫu lâm sàng (ví dụ như dịch mũi, mô sâu, đờm và máu) được lấy từ người bệnh có triệu chứng hoặc dấu hiệu chẩn đoán nhiễm trùng. Mẫu sàng lọc (như phết mũi, đày chày và họng) được thu thập để xác định các trường hợp vi khuẩn cư trú không gây bệnh.

- Định nghĩa kháng methicillin trong phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng là nồng độ ức chế tối thiểu oxacillin (MIC)  $\geq 4$  mcg/mL(6). Những phương pháp khác phát hiện, như sử dụng xét nghiệm khuếch tán đĩa cefoxitin hoặc một số phản ứng chuỗi polymerase để phát hiện các gen mec. MIC  $\leq 2$  mcg / mL được coi là nhạy cảm.

## **2. Nguyên lý của kỹ thuật xác định trực khuẩn Gram âm sinh ESBL**

- Men beta-lactamase phổ rộng (Extended Spectrum Beta-Lactamase - ESBL) được tìm thấy lần đầu tiên năm 1983 tại Đức, thường gặp trong các chủng vi khuẩn đường ruột đặc biệt là Klebsiella sp, E.coli. ESBL hiện diện trên các vi khuẩn gram âm, chủ yếu như Klebsiella pneumonia, Klebsiella oxytoca và Escherichia coli và một số vi khuẩn khác như Acinetobacter, Burkholderia, Citrobacter, Enterobacter, Morganella, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia và Shigella spp. Khi các chủng vi khuẩn sinh ESBL thì đồng nghĩa với việc chúng kháng lại rất nhiều các kháng sinh, đặc biệt là nhóm cephalosporin. Đây là gánh nặng thực sự trong điều trị nhiễm trùng trực khuẩn gram (-). Những vi khuẩn sinh ESBL có thể mắc do lây truyền từ người này sang người khác, hoặc do được chọn lọc qua việc dùng kháng sinh. Vì vậy việc phòng chống, giảm thiểu những vấn đề do những vi khuẩn đó gây nên chính là việc chống nhiễm khuẩn tốt tại các trung tâm chăm sóc đặc biệt và sử dụng kháng sinh hợp lý cho những bệnh nhân phải điều trị dài ngày. Nhờ mang những men này mà vi khuẩn có khả năng kháng lại các kháng sinh trước đây đã từng tiêu diệt nó.

- Tại Việt nam, Theo thông báo của Bộ Y tế năm 2003, vi khuẩn đường ruột sinh ESBL là nguyên nhân của 30-50% các trường hợp nhiễm khuẩn Bệnh viện, các chủng VK đường ruột có ESBL dao động lớn tùy theo từng khu vực.

## **3. Quy trình kỹ thuật xác định MRSA**

Theo hướng dẫn của CLSI 2020: Vi khuẩn được nuôi cấy, phân lập và định danh theo thường quy. Trục khuẩn Gram âm phân lập được làm thử nghiệm kháng sinh đồ, xác định ESBL.

**QUY TRÌNH KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH MRSA**  
(*Methicillin resistance Staphylococcus aureus*)

STT	Nội dung	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
1	Chuẩn bị thiết bị và đồ dùng	Thiết bị, đồ dùng sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	<p>Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn, sắp xếp ngăn nắp các mục:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Găng tay, khẩu trang</li> <li>- Dung dịch sát khuẩn</li> <li>- Tủ ATSH,</li> <li>- Đèn cồn, que cấy,</li> <li>- Lam kính khô sạch</li> <li>- Bút viết kính</li> </ul>
2	Chuẩn bị hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm	Hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	<p>Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn, sắp xếp ngăn nắp:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dải Etest</li> <li>- Canh thang Mueller-Hinton 0,5 ml</li> <li>- Thạch đĩa Muller Hinton</li> <li>- Kháng sinh bột sử dụng cho nghiên cứu thử nghiệm</li> <li>- Độ đục chuẩn McFarland 0,5</li> <li>- Nước muối 0,85% vô trùng</li> <li>- Chủng vi khuẩn thuần, mới 18-24 giờ.</li> </ul>
3	Kiểm tra đôi chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu	Khớp thông tin bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm	Đôi chiếu và kiểm tra đúng thông tin trên

	xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.		bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân	Khớp mã số mẫu hoặc thông tin bệnh nhân	Ghi đúng mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân
5	Chọn kháng sinh Cefoxitin (FOX)	Chuẩn bị kháng sinh dành cho vi khuẩn giúp cho kỹ thuật thuận lợi.	Đúng kháng sinh cho vi khuẩn
6	Chuẩn bị môi trường MH làm KSD	Chuẩn bị môi trường MH sẵn giúp cho kỹ thuật thuận lợi.	Đúng môi trường MH
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường	Đĩa môi trường được ghi thông tin đúng	Ghi đúng thông tin lên đĩa môi trường
8	Pha huyền dịch vi khuẩn	Pha loãng khuẩn lạc trước khi cấy lên môi trường	Độ đục của huyền dịch so với ống đo độ đục Mc Farland tương đương nhau
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn	Chuẩn bị cho quá trình ria cấy	Đầu bông phải thấm đều huyền dịch
10	Ria cấy	Cấy đều vi khuẩn lên trên mặt thạch	Vi khuẩn được trải đều trên mặt thạch, Đường cấy đều, phủ kín mặt thạch.
11	Đặt khoanh FOX	Để vi khuẩn có thể tiếp xúc với kháng sinh	Đặt đúng vị trí, không để chạm thành.
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm	Để vi khuẩn có đủ điều kiện để phát triển	Đặt đúng vào tủ ấm, nhiệt độ thích hợp
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ	Để vi khuẩn có thời gian để phát triển	Đọc được kết quả vi khuẩn
14	Nhận định kết quả theo CLSI	Dựa vào CLSI để xem mức độ nhạy cảm của kháng sinh với vi khuẩn	Biết cách đọc, nhận định mức độ nhạy cảm được kết quả S,I,R
15	Trả kết quả	Để xác định được vi khuẩn nhạy cảm, hay đề kháng	Đúng người bệnh, đúng kết quả.

16	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	Dụng cụ được thu dọn và xử lý	An toàn, đúng quy định Có sử dụng dung dịch diệt khuẩn
17	Rửa tay	Bàn tay sạch khi kết thúc nhiệm vụ	Sạch và đúng quy định
18	Ghi kết quả vào sổ lưu	Ghi lại kết quả vào sổ để lưu lại	Ghi được đúng cột, đúng tên bệnh nhân, đúng mẫu bệnh phẩm

#### 4. Quy trình kỹ thuật xác định ESBL

Theo hướng dẫn của CLSI 2020

- Kỹ thuật sàng lọc ESBL
- Kỹ thuật xác định kiểu hình

### QUY TRÌNH

#### KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH VI KHUẨN SINH ESBL (Extended spectrum $\beta$ - lactamase)

STT	Nội dung	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
1	Chuẩn bị thiết bị và đồ dùng	Thiết bị, đồ dùng sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn, sắp xếp ngăn nắp các mục: - Găng tay, khẩu trang - Dung dịch sát khuẩn - Tủ ATSH, - Đèn cồn, que cấy, - Lam kính khô sạch - Bút viết kính
2	Chuẩn bị hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm	Hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn, sắp xếp ngăn nắp: - Chủng vi khuẩn thuần, mới 18-24 giờ. - Dải Etest - Canh thang Mueller-Hinton 0,5 ml - Thạch đĩa Muller Hinton

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kháng sinh bột sử dụng cho nghiên cứu thử nghiệm</li> <li>- Độ đục chuẩn McFarland 0,5</li> <li>- Nước muối 0,85% vô trùng</li> <li>- Chủng vi khuẩn thuần, mới 18-24 giờ.</li> </ul>
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.	Khớp thông tin bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm	Đối chiếu và kiểm tra đúng thông tin trên bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân	Khớp mã số mẫu hoặc thông tin bệnh nhân	Ghi đúng mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân
5	Chọn 4 -5 kháng sinh để đặt xác định ESBL (AMC, CAZ, CTX, CRO, FEP...)	Chọn kháng sinh trước giúp cho thao tác diễn gia dễ dàng thuận lợi	Đúng loại kháng sinh, đúng liều lượng kháng sinh phù hợp vi khuẩn theo CLSI
6	Chuẩn bị môi trường MH	Giúp cho thao tác diễn gia dễ dàng thuận lợi hơn	Lấy được đúng môi trường MH để ở nhiệt độ phòng
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường	Đĩa môi trường được ghi thông tin đúng	Ghi đúng thông tin lên đĩa môi trường
8	Pha huyền dịch vi khuẩn	Pha loãng khuẩn lạc trước khi cấy lên môi trường	Độ đục của huyền dịch so với ống đo độ đục Mc Farland tương đương nhau
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn	Chuẩn bị cho quá trình ria cấy	Đầu bông phải thấm đều huyền dịch
10	Ria cấy	Cấy đều vi khuẩn lên trên mặt thạch	Vi khuẩn được trải đều trên mặt thạch, Đường cấy đều, phủ kín mặt thạch.
11	Đặt khoanh kháng sinh	Để vi khuẩn có thể tiếp	Đặt đúng vị trí, không

	đặt AMC ở giữa và 4 khoan còn lại đặt xung quanh theo nguyên tắc khoan cách khoan 2 cm, khoan cách thành 1 cm.	xúc với kháng sinh	để sát thành, không đặt quá xa cũng không quá gần
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm	Để vi khuẩn có đủ điều kiện để phát triển	Đặt đúng vào tủ ấm, nhiệt độ thích hợp
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ	Để vi khuẩn có thời gian để phát triển	Đọc được kết quả vi khuẩn
14	Đọc kết quả theo CLSI	Dựa vào bảng CLSI	Đọc được đúng kết quả theo CLSI
15	Nhận định kết quả	Dựa vào CLSI để xem mức độ nhạy cảm của kháng sinh với vi khuẩn	Biết cách đọc, nhận định mức độ nhạy cảm được kết quả S,I,R
16	Trả kết quả	Để xác định được vi khuẩn nhạy cảm, hay đề kháng	Đúng người bệnh, đúng kết quả.
17	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	Dụng cụ được thu dọn và xử lý	An toàn, đúng quy định Có sử dụng dung dịch diệt khuẩn
18	Rửa tay	Bàn tay sạch khi kết thúc nhiệm vụ	Sạch và đúng quy định
19	Ghi kết quả vào sổ lưu	Ghi lại kết quả vào sổ để lưu lại	Ghi được đúng cột, đúng tên bệnh nhân, đúng mẫu bệnh phẩm

### 5. Nhận định kết quả.

#### - MRSA

+ Nhận định mức độ nhạy cảm được kết quả S,I,R

+ So sánh đối chiếu kết quả theo nhóm, so sánh kết quả giữa lý thuyết và thực hành

+ Các sai số có thể xảy ra và cách khắc phục

#### - ESBL

+ Nhận định mức độ nhạy cảm được kết quả S,I,R

+ So sánh đối chiếu kết quả theo nhóm, so sánh kết quả giữa lý thuyết và

thực hành

+ Các sai số có thể xảy ra và cách khắc phục

### **LƯỢNG GIÁ**

1. Trình bày nguyên lý của kỹ thuật xác định tụ cầu vàng kháng methicillin (MRSA)?
2. Trình bày nguyên lý của kỹ thuật xác định một số trực khuẩn gram âm sinh enzym  $\beta$ - lactamase phổ mở rộng (ESBL)?
3. Mô tả quy trình kỹ thuật xác định MRSA?
4. Mô tả quy trình kỹ thuật xác định trực khuẩn gram âm sinh ESBL?



## PHẦN THỰC HÀNH

### BÀI 4. THỰC HÀNH KỸ THUẬT KHÁNG SINH ĐỒ ĐỊNH LƯỢNG

#### MỤC TIÊU

##### \* **Kỹ năng**

1. Thực hiện được các bước kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)
2. Nhận định được kết quả của kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu.

##### \* **Năng lực tự chủ và chịu trách nhiệm**

3. Cẩn thận, trung thực và an toàn trong khi thực hiện kỹ thuật.
4. Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.

#### NỘI DUNG

##### 1. Nguyên lý kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Kháng sinh được hoà đều trong môi trường lỏng hoặc môi trường đặc nên tại bất kỳ điểm nào trong môi trường, nồng độ kháng sinh đều như nhau. Kháng sinh được pha loãng thành nhiều nồng độ khác nhau (thường là pha loãng theo cấp số nhân). Một lượng vi khuẩn nhất định như nhau được cấy vào môi trường có nồng độ kháng sinh khác nhau. Ở nồng độ kháng sinh nào còn thấy vi khuẩn phát triển là vi khuẩn có khả năng đề kháng với kháng sinh tại nồng độ đó. Nồng độ kháng sinh pha loãng nhất có khả năng ức chế được sự phát triển của vi khuẩn được gọi là nồng độ ức chế tối thiểu.

##### 2. Kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu trên môi trường đặc

###### 2.1. Chuẩn bị

- Thiết bị, dụng cụ:

- + Tủ ấm
- + Máy vortex
- + Đèn cồn, que cấy, ống nghiệm
- + Panh kẹp, kéo
- + Que tăm bông (que gòn) vô trùng
- + Hóa chất và môi trường:
- + Dải Etest

- Hóa chất và môi trường

- + Canh thang Mueller-Hinton 0,5 ml
- + Thạch đĩa Muller Hinton
- + Kháng sinh bột sử dụng cho nghiên cứu thử nghiệm
- + Độ đục chuẩn McFarland 0,5
- + Nước muối 0,85% vô trùng

+ Chất khử nhiễm

- Bệnh phẩm: Chủng vi khuẩn thuần, mới 16-24 giờ.

## 2.2. Tiến hành

### Kỹ thuật xác định MIC vancomycin của *S. aureus* bằng E- test

STT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc
	Chuẩn bị hóa chất
	Chuẩn bị bệnh phẩm
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân
5	Lấy E- test vancomycin
6	Chuẩn bị môi trường MH làm KSD
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường
8	Pha huyền dịch vi khuẩn
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn
10	Ria cấy
11	Đặt thanh E- test vancomycin
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ẩm
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ
14	Nhận định kết quả theo CLSI
15	Trả kết quả
16	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
17	Rửa tay
18	Ghi kết quả vào sổ lưu

## 2.3. Các bước cần lưu ý

- Nhận định kết quả kỹ thuật
- Các sai số và cách khắc phục
- Sau ủ ẩm 16 - 24 giờ và khi thấy rõ vi khuẩn mọc, đọc giá trị MIC ở điểm cắt của hình elip với dải Etest. Không đọc kết quả khi bị lẫn hai hay nhiều chủng vi khuẩn, khi vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.

- Làm tròn giá trị MIC ở điểm giữa hai bậc pha loãng lên giá trị cao hơn trước khi phiên giải kết quả.

- Phiên giải kết quả MIC ra giá trị S, I hoặc R theo hướng dẫn của CLSI cập nhật hàng năm.

- Với các kháng sinh diệt khuẩn, phải đọc giá trị MIC tại điểm vi khuẩn bị ức chế hoàn toàn. Đặc biệt chú ý khi đọc với chủng Pneumococci, Streptococci, Enterococci, Acinetobacter và Stenotrophomonas spp. Với các kháng sinh kìm khuẩn, phải đọc giá trị MIC tại điểm vi khuẩn bị ức chế 80%.

### 3. Tổ chức dạy học

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh – ký sinh trùng.
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm.
- Sử dụng kết quả nuôi cấy thực tế để dạy học.
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật.
- Sinh viên tự học từ các kết quả nuôi cấy thực tế khác nhau.
- Sử dụng thang điểm để đánh giá.

### LƯỢNG GIÁ

**Nội dung: Lượng giá theo mục tiêu bằng thang điểm**

**Thang điểm kỹ thuật xác định MIC vancomycin của S. aureus bằng E- test**

STT	NỘI DUNG	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
1.	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc				
	Chuẩn bị hóa chất				
	Chuẩn bị bệnh phẩm				
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.				
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân				
5	Lấy E- test vancomycin				
6	Chuẩn bị môi trường MH làm KSD				
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường				

8	Pha huyền dịch vi khuẩn				2
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn				2
10	Ria cây				2
11	Đặt thanh E- test vancomycin				2
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ẩm				
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ				
14	Nhận định kết quả theo CLSI				2
15	Trả kết quả				
16	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
17	Rửa tay				
18	Ghi kết quả vào sổ lưu				
	<b>Tổng điểm</b>				

\* Quy định:

- Không làm: 0 điểm
- Làm sai/ thiếu: 1 điểm
- Làm đúng và đủ: 2 điểm

\* Đánh giá năng lực tự chủ và trách nhiệm: Sinh viên thể hiện tác phong cẩn thận, chính xác, trung thực trong khi thực hiện kỹ thuật

- Thể hiện tốt : 4 điểm
- Thể hiện trung bình: 2 điểm
- Không thể hiện được : 0 điểm

Tổng điểm tối đa: 50

Quy đổi sang thang điểm 10

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50

Sinh viên đạt yêu cầu khi đạt mức điểm từ 5 trở lên trên thang điểm 10.

## CÁC PHỤ LỤC

### 1. Quy trình

#### Phụ lục 1: Quy trình kỹ thuật xác định MIC vancomycin của S. aureus bằng E- test

STT	Nội dung	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
1	Chuẩn bị thiết bị và	Thiết bị, đồ dùng	Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn,

	đồ dùng	sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	sắp xếp ngăn nắp các mục: - Găng tay, khẩu trang - Dung dịch sát khuẩn - Tủ ATSH, - Đèn cồn, que cấy, - Lam kính khô sạch - Bút viết kính
2	Chuẩn bị hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm	Hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn, sắp xếp ngăn nắp: - Chủng vi khuẩn thuần, mới 18-24 giờ. - Dải Etest - Canh thang Mueller-Hinton 0,5 ml - Thạch đĩa Muller Hinton - Kháng sinh bột sử dụng cho nghiên cứu thử nghiệm - Độ đục chuẩn McFarland 0,5 - Nước muối 0,85% vô trùng - Chủng vi khuẩn thuần, mới 18-24 giờ.
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.	Khớp thông tin bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm	Đối chiếu và kiểm tra đúng thông tin trên bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân	Khớp mã số mẫu hoặc thông tin bệnh nhân	Ghi đúng mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân
5	Lấy E-test vancomycin	Lấy sẵn thuận tiện cho thao tác kỹ thuật	Lấy được đúng dải E-test vancomycin
6	Chuẩn bị môi trường MH làm KSD	Lấy môi trường MH thuận tiện cho thao tác kỹ thuật	Lấy đúng môi trường MH

7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường	Đĩa môi trường được ghi thông tin đúng	Ghi đúng thông tin lên đĩa môi trường
8	Pha huyền dịch vi khuẩn	Pha loãng khuẩn lạc trước khi cấy lên môi trường	Độ đục của huyền dịch so với ống đo độ đục Mc Farland tương đương nhau
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn	Chuẩn bị cho quá trình ria cấy	Đầu bông phải thấm đều huyền dịch
10	Ria cấy	Cấy đều vi khuẩn lên trên mặt thạch	Vi khuẩn được trải đều trên mặt thạch, Đường cấy đều, phủ kín mặt thạch.
11	Đặt thanh E- test vancomycin	Để vi khuẩn có thể tiếp xúc với kháng sinh	Đặt đúng vị trí, không để chạm thành.
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm	Để vi khuẩn có đủ điều kiện để phát triển	Đặt đúng vào tủ ấm, nhiệt độ thích hợp
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ	Để vi khuẩn có đủ điều kiện để phát triển	Đọc được kết quả vi khuẩn
14	Nhận định kết quả theo CLSI	Dựa vào CLSI để xem mức độ nhạy cảm của kháng sinh với vi khuẩn	Biết cách đọc, nhận định mức độ nhạy cảm được kết quả S,I,R
15	Trả kết quả	Để xác định được vi khuẩn nhạy cảm, hay đề kháng	Đúng người bệnh, đúng kết quả.
16	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	Dụng cụ được thu dọn và xử lý	An toàn, đúng quy định Có sử dụng dung dịch diệt khuẩn
17	Rửa tay	Bàn tay sạch khi kết thúc nhiệm vụ	Sạch và đúng quy định
18	Ghi kết quả vào sổ lưu	Ghi lại kết quả vào sổ để lưu lại	Ghi được đúng cột, đúng tên bệnh nhân, đúng mẫu bệnh phẩm

## 2. Bảng kiểm

### Phụ lục 2: Bảng kiểm kỹ thuật xác định MIC vancomycin của *S. aureus* bằng E- test

STT	NỘI DUNG	Đánh giá	
		Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng		
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc		
	Chuẩn bị hóa chất		
	Chuẩn bị bệnh phẩm		
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.		
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân		
5	Lấy E- test vancomycin		
6	Chuẩn bị môi trường MH làm KSD		
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường		
8	Pha huyền dịch vi khuẩn		
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn		
10	Ria cấy		
11	Đặt thanh E- test vancomycin		
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm		
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ		
14	Nhận định kết quả theo CLSI		
15	Trả kết quả		
16	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
17	Rửa tay		
18	Ghi kết quả vào sổ lưu		

## BÀI 5. THỰC HÀNH KỸ THUẬT LƯU GIỮ CHỦNG VI KHUẨN

### MỤC TIÊU

#### \* Kỹ năng

1. Chuẩn bị được chủng cần lưu giữ đạt yêu cầu
2. Thực hiện được các bước lưu giữ chủng vi khuẩn

#### \* Năng lực tự chủ và chịu trách nhiệm

3. Cẩn thận, trung thực và an toàn trong khi thực hiện kỹ thuật.
4. Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.

### NỘI DUNG

#### 1. Nguyên lý của kỹ thuật

Chủng vi khuẩn thuần nhất được phân lập và định danh. Chủng vi khuẩn được cấy vào môi trường lưu trữ để đảm bảo duy trì sự sống và giữ được tính chất sinh vật hóa học. Phương pháp lưu trữ chuẩn cần hạn chế tối đa xảy ra đột biến trên chủng vi khuẩn. Chủng lưu trữ để phục vụ cho mục đích chẩn đoán, kiểm tra chất lượng, hồi cứu và các nghiên cứu thực nghiệm tiếp theo.

#### 2. Chuẩn bị

- Thiết bị, dụng cụ:

- + Tủ an toàn sinh học (ATSH) cấp 2
- + Kính hiển vi quang học.
- + Máy ly tâm - Máy trộn, lắc
- + Ống vô trùng có nắp đậy.
- + Pipet Pasteur vô trùng
- + Tủ lạnh, tủ  $-20^{\circ}\text{C}$ , tủ  $-80^{\circ}\text{C}$ , bình ni-tơ lỏng, máy làm đông khô.
- + Ống hộp lưu giữ chủng
- + Chổi, hốt rác
- + 2 loại xô đựng rác thải là Xanh và Vàng

#### 3. Tiến hành

#### Kỹ thuật lưu trữ chủng vi khuẩn

STT	NỘI DUNG
1	Chuẩn bị thiết bị và đồ dùng
2	Chuẩn bị hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.



4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân
5	Phân lập vi khuẩn
6	Định danh vi khuẩn
7	Cấy vào môi trường
8	Bảo quản lạnh
9	Định kỳ kiểm tra (cấy ra mt, nhiệt độ tủ)
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
11	Rửa tay
12	Ghi kết quả vào sổ lưu

#### 4. Nhận định kết quả

- Bệnh phẩm phải đựng trong ống vô khuẩn.
- Đảm bảo còn sự nguyên vẹn của test và còn hạn sử dụng.
- Khi làm test: nên thực hiện trong tủ an toàn sinh học, khi làm xét nghiệm cần vô khuẩn tránh bị nhiễm từ bên ngoài vào, ảnh hưởng đến xét nghiệm.
- Đọc kết quả đúng thời gian quy định của nhà sản xuất.
- Nhận định kết quả kỹ thuật.
- Các sai số và cách khắc phục.

#### 5. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh – ký sinh trùng.
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm.
- Sử dụng kết quả nuôi cấy thực tế để dạy học.
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật.
- Sinh viên tự học từ các kết quả nuôi cấy thực tế khác nhau.
- Sử dụng thang điểm để đánh giá.

### LƯỢNG GIÁ

#### Nội dung: Lượng giá theo mục tiêu bằng thang điểm

##### Thang điểm kỹ thuật lưu trữ chủng vi khuẩn

STT	Nội dung	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
1	Chuẩn bị thiết bị và đồ dùng				
2	Chuẩn bị hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm				
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh				

	phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.				
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân				
5	Phân lập vi khuẩn				
6	Định danh vi khuẩn				2
7	Cấy vào môi trường				
8	Bảo quản lạnh				
9	Định kỳ kiểm tra (cấy ra mt, nhiệt độ tủ)				
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
11	Rửa tay				
12	Ghi kết quả vào sổ lưu				

Quy định:

\* Quy định:

- Không làm: 0 điểm
- Làm sai/ thiếu: 1 điểm
- Làm đúng và đủ: 2 điểm

\* Đánh giá năng lực tự chủ và trách nhiệm: Sinh viên thể hiện tác phong cẩn thận, chính xác, trung thực trong khi thực hiện kỹ thuật

- Thể hiện tốt : 4 điểm
- Thể hiện trung bình: 2 điểm
- Không thể hiện được : 0 điểm

Tổng điểm tối đa: 30

Quy đổi sang thang điểm 10

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24	25-27	28-30

Sinh viên đạt yêu cầu khi đạt mức điểm từ 5 trở lên trên thang điểm 10.

## CÁC PHỤ LỤC

### 1. Quy trình

#### Phụ lục 1: Quy trình kỹ thuật lưu trữ chủng vi khuẩn

STT	Nội dung	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn cần đạt
1	Chuẩn bị thiết bị và đồ dùng	Thiết bị, đồ dùng sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn, sắp xếp ngăn nắp các mục: <ul style="list-style-type: none"><li>- Găng tay, khẩu trang</li><li>- Dung dịch sát khuẩn</li><li>- Tủ ATSH,</li><li>- Đèn cồn, que cấy,</li><li>- Lam kính khô sạch</li><li>- Bút viết kính</li></ul>
2	Chuẩn bị hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm	Hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	<ul style="list-style-type: none"><li>- Thạch TM</li><li>- Thạch Máu</li><li>- Thạch Macconkey</li><li>- Thạch schapman</li><li>- Khoanh giấy oxidase</li><li>- Môi trường Citrate Simmons</li><li>- Môi trường Ure – Indol</li><li>- Môi trường Mannit</li><li>- Môi trường Kia</li><li>- Protein A</li><li>- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li><li>- Nước muối sinh lý vô khuẩn</li><li>- Huyết tương cừu, thỏ</li></ul>
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.	Khớp thông tin bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm	Đối chiếu và kiểm tra đúng thông tin trên bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân Ghi mã số	Khớp mã số mẫu hoặc thông tin bệnh nhân	Ghi đúng mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân

	mẫu hoặc họ tên bệnh nhân		
5	Phân lập vi khuẩn	Có được vi khuẩn thuần	Có được vi khuẩn thuần chủng phục vụ cho việc lưu giữ
6	Định danh vi khuẩn	Định danh được vi khuẩn, tên vi khuẩn	Định danh được đúng tên loài, chi
7	Cấy vào môi trường	Lưu giữ chủng vi khuẩn	Cấy đều tay, đường cấy không thừa, không dày, đủ lượng vi khuẩn để có thể mọc trên môi trường
8	Bảo quản lạnh	Lưu giữ chủng vi khuẩn	Đề đúng vào tủ lạnh, bảo quản ở nhiệt độ phù hợp
9	Định kỳ kiểm tra (cấy ra mt, nhiệt độ tủ)	Đảm bảo được chất lượng của chủng	Cấy sang môi trường khác để thử nghiệm vi khuẩn còn hoạt động hay không, nhiệt độ tủ có nằm trong ngưỡng phù hợp để lưu giữ được chủng, mà không làm chết vi khuẩn.
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	Dụng cụ được thu dọn và xử lý	An toàn, đúng quy định Có sử dụng dung dịch diệt khuẩn
11	Rửa tay	Bàn tay sạch khi kết thúc nhiệm vụ	Sạch và đúng quy định
12	Ghi kết quả vào sổ lưu	Ghi lại kết quả vào sổ để lưu lại	Ghi được đúng cột, đúng tên bệnh nhân, đúng mẫu bệnh phẩm

## 2. Bảng kiểm

### Phụ lục 2: Bảng kiểm kỹ thuật lưu trữ chủng vi khuẩn

STT	Nội dung	Đánh giá	
		Đạt	Không Đạt
1	Chuẩn bị thiết bị và đồ dùng		
2	Chuẩn bị hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm		
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét		

	nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.		
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân		
5	Phân lập vi khuẩn		
6	Định danh vi khuẩn		
7	Cấy vào môi trường		
8	Bảo quản lạnh		
9	Định kỳ kiểm tra (cấy ra mt, nhiệt độ tủ)		
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
11	Rửa tay		
12	Ghi kết quả vào sổ lưu		

## **BÀI 6. THỰC HÀNH KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH VI KHUẨN KHÁNG THUỐC MỤC TIÊU**

### **\* Kỹ năng**

1. Thực hiện được đúng quy trình kỹ thuật xác định MRSA.
2. Thực hiện được đúng quy trình kỹ thuật xác định ESBL.
3. Nhận định được kết quả vi khuẩn MRSA và vi khuẩn sinh ESBL.

### **\* Năng lực tự chủ và chịu trách nhiệm**

4. Cẩn thận, trung thực và an toàn trong khi thực hiện kỹ thuật.
5. Hình thành được kỹ năng làm việc độc lập và khả năng phối hợp trong làm việc nhóm trong khi thực hành.

## **NỘI DUNG**

### **1. Nguyên tắc**

+ *Nguyên tắc của kỹ thuật xác định tụ cầu vàng kháng methicillin*

Tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) là một cầu khuẩn Gram dương, không có lông, không di động, không sinh nha bào. *S.aureus* tìm thấy trong hệ vi sinh vật cư trú tại màng nhầy mũi ở 20 – 40% dân số nói chung. Khi hàng rào nhầy và da bị tổn thương, ví dụ như các bệnh da mạn tính, vết thương, phẫu thuật, *S.aureus* có thể xâm nhập vào các lớp mô dưới da hoặc máu và gây nhiễm trùng. Người bệnh có các dụng cụ y tế xâm lấn như catheter tĩnh mạch trung tâm và ngoại vi hoặc suy giảm hệ miễn dịch có nguy cơ nhiễm *S.aureus*.

Methicillin là một penicillin bán tổng hợp bảo vệ vòng betalactam không bị thủy phân bởi penicillinase được giới thiệu vào năm 1959, ngay sau khi được đưa vào sử dụng trên lâm sàng, tụ cầu vàng kháng methicillin (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* – MRSA) đã được báo cáo. Sự bùng phát của MRSA xảy ra ở châu Âu vào đầu những năm 1960. Do độc tính, hiện nay methicillin không còn được sử dụng cho người và thay vào đó là các penicillin ổn định hơn như oxacillin, flucloxacillin và dicloxacillin. Dù vậy, thuật ngữ tụ cầu vàng kháng methicillin vẫn tiếp tục được sử dụng. Bên cạnh đó, MRSA còn có khả năng kháng nhiều nhóm kháng sinh khác đã trở thành vấn đề lớn.

MRSA khá phổ biến ở hầu hết các bệnh viện ở châu Á, tỷ lệ MRSA chiếm tới 50% các nhiễm trùng huyết do tụ cầu vàng. Tỷ lệ kháng methicillin cao liên quan đến tình trạng sử dụng kháng sinh rộng rãi cũng như tình trạng dân số đông là điều kiện thuận lợi để lan truyền nhanh các chủng đề kháng.

MRSA có thể gây ra nhiều loại nhiễm trùng, như SSTIs, viêm phổi, nhiễm trùng xương khớp, hội chứng sốc nhiễm độc (là một biến chứng hiếm gặp, đe dọa

tính mạng) và nhiễm trùng huyết, có thể dẫn đến viêm nội tâm mạc hoặc sốc nhiễm khuẩn.

Mẫu bệnh phẩm vi sinh liên quan đến MRSA có thể phân làm hai loại: mẫu lâm sàng và mẫu sàng lọc. Mẫu lâm sàng (ví dụ như dịch mũi, mô sâu, đờm và máu) được lấy từ người bệnh có triệu chứng hoặc dấu hiệu chẩn đoán nhiễm trùng. Mẫu sàng lọc (như phết mũi, đày chày và họng) được thu thập để xác định các trường hợp vi khuẩn cư trú không gây bệnh.

Định nghĩa kháng methicillin trong phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng là nồng độ ức chế tối thiểu oxacillin (MIC)  $\geq 4$  mcg/mL(6). Những phương pháp khác phát hiện, như sử dụng xét nghiệm khuếch tán đĩa cefoxitin hoặc một số phản ứng chuỗi polymerase để phát hiện các gen mec. MIC  $\leq 2$  mcg / mL được coi là nhạy cảm.

#### + Nguyên tắc của kỹ thuật xác định trực khuẩn gram âm sinh ESBL

Men beta-lactamase phổ rộng (Extended Spectrum Beta-Lactamase - ESBL) được tìm thấy lần đầu tiên năm 1983 tại Đức, thường gặp trong các chủng vi khuẩn đường ruột đặc biệt là Klebsiella sp, E.coli. ESBL hiện diện trên các vi khuẩn gram âm, chủ yếu như Klebsiella pneumonia, Klebsiella oxytoca và Escherichia coli và một số vi khuẩn khác như Acinetobacter, Burkholderia, Citrobacter, Enterobacter, Morganella, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia và Shigella spp. Khi các chủng vi khuẩn sinh ESBL thì đồng nghĩa với việc chúng kháng lại rất nhiều các kháng sinh, đặc biệt là nhóm cephalosporin. Đây là gánh nặng thực sự trong điều trị nhiễm trùng trực khuẩn gram (-). Những vi khuẩn sinh ESBL có thể mắc do lây truyền từ người này sang người khác, hoặc do được chọn lọc qua việc dùng kháng sinh. Vì vậy việc phòng chống, giảm thiểu những vấn đề do những vi khuẩn đó gây nên chính là việc chống nhiễm khuẩn tốt tại các trung tâm chăm sóc đặc biệt và sử dụng kháng sinh hợp lý cho những bệnh nhân phải điều trị dài ngày. Nhờ mang những men này mà vi khuẩn có khả năng kháng lại các kháng sinh trước đây đã từng tiêu diệt nó.

Tại Việt nam, Theo thông báo của Bộ Y tế năm 2003, vi khuẩn đường ruột sinh ESBL là nguyên nhân của 30-50% các trường hợp nhiễm khuẩn Bệnh viện, các chủng VK đường ruột có ESBL dao động lớn tùy theo từng khu vực.

## 2. Chuẩn bị

- Thiết bị, dụng cụ:

- + Tủ ATSH cấp 2.
- + Que cấy.
- + Đèn cồn.

- + Chổi, hốt rác.
- + 2 loại xô đựng rác thải là Xanh và Vàng.
- Hóa chất và môi trường
- Chất khử nhiễm.

### 3. Tiến hành

#### 3.1. Kỹ thuật xác định MRSA

STT	NỘI DUNG
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc
	Chuẩn bị hóa chất
	Chuẩn bị bệnh phẩm
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân
5	Chọn kháng sinh Cefoxitin (FOX)
6	Chuẩn bị môi trường MH làm KSD
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường
8	Pha huyền dịch vi khuẩn
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn
10	Ria cấy
11	Đặt khoanh FOX
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ẩm
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ
14	Nhận định kết quả theo CLSI
15	Trả kết quả
16	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
17	Rửa tay
18	Ghi kết quả vào sổ lưu

#### 3.2. Kỹ thuật xác định ESBL

STT	NỘI DUNG
1	Chuẩn bị nhân viên y tế



	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc
	Chuẩn bị hóa chất
	Chuẩn bị bệnh phẩm
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân
5	Chọn 4-5 kháng sinh để đặt xác định ESBL (AMC, CAZ, CTX, CRO, FEP...)
6	Chuẩn bị môi trường MH
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường
8	Pha huyền dịch vi khuẩn
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn
10	Ria cấy
11	Đặt khoan kháng sinh đặt AMC ở giữa và 4 khoan còn lại đặt xung quanh theo nguyên tắc khoan cách khoan 2 cm, khoan cách thành 1 cm.
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm
13	Đọc kết quả sau 18-24h
14	Đọc kết quả theo CLSI
15	Nhận định kết quả
16	Trả kết quả
17	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
18	Rửa tay
19	Ghi kết quả vào sổ lưu

#### 4. Nhận định kết quả

- Bệnh phẩm phải đựng trong ống vô khuẩn.
- Đảm bảo còn sự nguyên vẹn của test và còn hạn sử dụng.
- Khi làm test: nên thực hiện trong tủ an toàn sinh học, khi làm xét nghiệm cần vô khuẩn tránh bị nhiễm từ bên ngoài vào, ảnh hưởng đến xét nghiệm.
- Đọc kết quả đúng thời gian quy định của nhà sản xuất.

- Nhận định kết quả kỹ thuật.
- Các sai số và cách khắc phục.

### 5. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại Phòng thực hành Vi sinh – ký sinh trùng.
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm.
- Sử dụng kết quả nuôi cấy thực tế để dạy học.
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật.
- Sinh viên tự học từ các kết quả nuôi cấy thực tế khác nhau.
- Sử dụng thang điểm để đánh giá.

## LƯỢNG GIÁ

**Nội dung: Lượng giá theo mục tiêu bằng thang điểm**

### 1. Thang điểm kỹ thuật xác định MRSA

STT	Nội dung	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc				
	Chuẩn bị hóa chất				
	Chuẩn bị bệnh phẩm				
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.				
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân				
5	Chọn kháng sinh Cefoxitin (FOX)				
6	Chuẩn bị môi trường MH làm KSD				
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường				2
8	Pha huyền dịch vi khuẩn				2
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn				
10	Ria cấy				2
11	Đặt khoanh FOX				
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm				
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ				2
14	Nhận định kết quả theo CLSI				2

15	Trả kết quả				
16	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
17	Rửa tay				
18	Ghi kết quả vào sổ lưu				
	<b>Tổng điểm</b>				

\* Quy định:

- Không làm: 0 điểm
- Làm sai/ thiếu: 1 điểm
- Làm đúng và đủ: 2 điểm

\* Đánh giá năng lực tự chủ và trách nhiệm: Sinh viên thể hiện tác phong cẩn thận, chính xác, trung thực trong khi thực hiện kỹ thuật

- Thể hiện tốt : 4 điểm
- Thể hiện trung bình: 2 điểm
- Không thể hiện được : 0 điểm

Tổng điểm tối đa: 50

Quy đổi sang thang điểm 10

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50

Sinh viên đạt yêu cầu khi đạt mức điểm từ 5 trở lên trên thang điểm 10.

## 2. Thang điểm kỹ thuật xác định ESBL

STT	Nội dung	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc				
	Chuẩn bị hóa chất				
	Chuẩn bị bệnh phẩm				
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.				
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân				
5	Chọn 4-5 kháng sinh để đặt xác định ESBL (AMC, CAZ, CTX, CRO, FEP...)				

6	Chuẩn bị môi trường MH				
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường				
8	Pha huyền dịch vi khuẩn				2
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn				
10	Ria cấy				2
11	Đặt khoanh kháng sinh đặt AMC ở giữa và 4 khoanh còn lại đặt xung quanh theo nguyên tắc khoanh cách khoanh 2 cm, khoanh cách thành 1 cm.				2
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm				
13	Đọc kết quả sau 18-24h				
14	Đọc kết quả theo CLSI				
15	Nhận định kết quả				2
16	Trả kết quả				
17	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
18	Rửa tay				
19	Ghi kết quả vào sổ lưu				
	<b>Tổng điểm</b>				

\* Quy định:

- Không làm: 0 điểm
- Làm sai/ thiếu: 1 điểm
- Làm đúng và đủ: 2 điểm

\* Đánh giá năng lực tự chủ và trách nhiệm: Sinh viên thể hiện tác phong cẩn thận, chính xác, trung thực trong khi thực hiện kỹ thuật

- Thể hiện tốt : 4 điểm
- Thể hiện trung bình: 2 điểm
- Không thể hiện được : 0 điểm

Tổng điểm tối đa: 50

Quy đổi sang thang điểm 10

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50

Sinh viên đạt yêu cầu khi đạt mức điểm từ 5 trở lên trên thang điểm 10.

## CÁC PHỤ LỤC

### 1. Quy trình

#### Phụ lục 1. Quy trình kỹ thuật xác định MRSA

STT	Nội dung	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
1	Chuẩn bị thiết bị và đồ dùng	Thiết bị, đồ dùng sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn, sắp xếp ngăn nắp các mục: <ul style="list-style-type: none"><li>- Găng tay, khẩu trang</li><li>- Dung dịch sát khuẩn</li><li>- Tủ ATSH,</li><li>- Đèn cồn, que cấy,</li><li>- Lam kính khô sạch</li><li>- Bút viết kính</li></ul>
2	Chuẩn bị hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm	Hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn, sắp xếp ngăn nắp: <ul style="list-style-type: none"><li>- Dải Etest</li><li>- Canh thang Mueller-Hinton 0,5 ml</li><li>- Thạch đĩa Muller Hinton</li><li>- Kháng sinh bột sử dụng cho nghiên cứu thử nghiệm</li><li>- Độ đục chuẩn McFarland 0,5</li><li>- Nước muối 0,85% vô trùng</li><li>- Chủng vi khuẩn thuần, mới 18-24 giờ.</li></ul>
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.	Khớp thông tin bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm	Đối chiếu và kiểm tra đúng thông tin trên bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh	Khớp mã số mẫu hoặc thông tin bệnh nhân	Ghi đúng mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân

	nhân		
5	Chọn kháng sinh Cefoxitin (FOX)	Chuẩn bị kháng sinh dành cho vi khuẩn giúp cho kỹ thuật thuận lợi.	Đúng kháng sinh cho vi khuẩn
6	Chuẩn bị môi trường MH làm KSD	Chuẩn bị môi trường MH sẵn giúp cho kỹ thuật thuận lợi.	Đúng môi trường MH
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường	Đĩa môi trường được ghi thông tin đúng	Ghi đúng thông tin lên đĩa môi trường
8	Pha huyền dịch vi khuẩn	Pha loãng khuẩn lạc trước khi cấy lên môi trường	Độ đục của huyền dịch so với ống đo độ đục McFarland tương đương nhau
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn	Chuẩn bị cho quá trình ria cây	Đầu bông phải thấm đều huyền dịch
10	Ria cây	Cấy đều vi khuẩn lên trên mặt thạch	Vi khuẩn được trải đều trên mặt thạch, Đường cấy đều, phủ kín mặt thạch.
11	Đặt khoanh FOX	Để vi khuẩn có thể tiếp xúc với kháng sinh	Đặt đúng vị trí, không để chạm thành.
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm	Để vi khuẩn có đủ điều kiện để phát triển	Đặt đúng vào tủ ấm, nhiệt độ thích hợp
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ	Để vi khuẩn có thời gian để phát triển	Đọc được kết quả vi khuẩn
14	Nhận định kết quả theo CLSI	Dựa vào CLSI để xem mức độ nhạy cảm của kháng sinh với vi khuẩn	Biết cách đọc, nhận định mức độ nhạy cảm được kết quả S,I,R
15	Trả kết quả	Để xác định được vi khuẩn nhạy cảm, hay đề kháng	Đúng người bệnh, đúng kết quả.
16	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	Dụng cụ được thu dọn và xử lý	An toàn, đúng quy định Có sử dụng dung dịch diệt

			khuẩn
17	Rửa tay	Bàn tay sạch khi kết thúc nhiệm vụ	Sạch và đúng quy định
18	Ghi kết quả vào sổ lưu	Ghi lại kết quả vào sổ để lưu lại	Ghi được đúng cột, đúng tên bệnh nhân, đúng mẫu bệnh phẩm

**Phụ lục 2. Quy trình kỹ thuật xác định vi khuẩn sinh ESBL**

STT	Nội dung	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
1	Chuẩn bị thiết bị và đồ dùng	Thiết bị, đồ dùng sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn, sắp xếp ngăn nắp các mục: - Găng tay, khẩu trang - Dung dịch sát khuẩn - Tủ ATSH, - Đèn cồn, que cấy, - Lam kính khô sạch - Bút viết kính
2	Chuẩn bị hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm	Hóa chất, môi trường, sinh bệnh phẩm sẵn sàng, giúp cho thao tác kỹ thuật thuận lợi	Đầy đủ, sạch hoặc vô khuẩn, sắp xếp ngăn nắp: - Chủng vi khuẩn thuần, mới 18-24 giờ. - Dải Etest - Canh thang Mueller-Hinton 0,5 ml - Thạch đĩa Muller Hinton - Kháng sinh bột sử dụng cho nghiên cứu thử nghiệm - Độ đục chuẩn McFarland 0,5 - Nước muối 0,85% vô trùng - Chủng vi khuẩn thuần, mới 18-24 giờ.
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc	Khớp thông tin bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm	Đối chiếu và kiểm tra đúng thông tin trên bệnh phẩm, phiếu xét nghiệm

	thông tin của người bệnh.		
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân	Khớp mã số mẫu hoặc thông tin bệnh nhân	Ghi đúng mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân
5	Chọn 4 -5 kháng sinh để đặt xác định ESBL (AMC, CAZ, CTX, CRO, FEP...)	Chọn kháng sinh trước giúp cho thao tác diễn gia dễ dàng thuận lợi	Đúng loại kháng sinh, đúng liều lượng kháng sinh phù hợp vi khuẩn theo CLSI
6	Chuẩn bị môi trường MH	Giúp cho thao tác diễn gia dễ dàng thuận lợi hơn	Lấy được đúng môi trường MH để ở nhiệt độ phòng
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường	Đĩa môi trường được ghi thông tin đúng	Ghi đúng thông tin lên đĩa môi trường
8	Pha huyền dịch vi khuẩn	Pha loãng khuẩn lạc trước khi cấy lên môi trường	Độ đục của huyền dịch so với ống đo độ đục Mc Farland tương đương nhau
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn	Chuẩn bị cho quá trình ria cấy	Đầu bông phải thấm đều huyền dịch
10	Ria cấy	Cấy đều vi khuẩn lên trên mặt thạch	Vi khuẩn được trải đều trên mặt thạch, Đường cấy đều, phủ kín mặt thạch.
11	Đặt khoanh kháng sinh đặt AMC ở giữa và 4 khoanh còn lại đặt xung quanh theo nguyên tắc khoanh cách khoanh 2 cm, khoanh cách thành 1 cm.	Để vi khuẩn có thể tiếp xúc với kháng sinh	Đặt đúng vị trí, không để sát thành, không đặt quá xa cũng không quá gần
12	Đặt đĩa KSD ở	Để vi khuẩn có đủ điều	Đặt đúng vào tủ ấm, nhiệt độ



	nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm	kiện để phát triển	thích hợp
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ	Để vi khuẩn có thời gian để phát triển	Đọc được kết quả vi khuẩn
14	Đọc kết quả theo CLSI	Dựa vào bảng CLSI	Đọc được đúng kết quả theo CLSI
15	Nhận định kết quả	Dựa vào CLSI để xem mức độ nhạy cảm của kháng sinh với vi khuẩn	Biết cách đọc, nhận định mức độ nhạy cảm được kết quả S,I,R
16	Trả kết quả	Để xác định được vi khuẩn nhạy cảm, hay đề kháng	Đúng người bệnh, đúng kết quả.
17	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	Dụng cụ được thu dọn và xử lý	An toàn, đúng quy định Có sử dụng dung dịch diệt khuẩn
18	Rửa tay	Bàn tay sạch khi kết thúc nhiệm vụ	Sạch và đúng quy định
19	Ghi kết quả vào sổ lưu	Ghi lại kết quả vào sổ để lưu lại	Ghi được đúng cột, đúng tên bệnh nhân, đúng mẫu bệnh phẩm

## 2. Bảng kiểm

### Phụ lục 3. Bảng kiểm quy trình kỹ thuật xác định MRSA

STT	Nội dung	Đánh giá	
		Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng		
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc		
	Chuẩn bị hóa chất		
	Chuẩn bị bệnh phẩm		
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.		
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân		

5	Chọn kháng sinh Cefoxitin (FOX)		
6	Chuẩn bị môi trường MH làm KSD		
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường		
8	Pha huyền dịch vi khuẩn		
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn		
10	Ria cây		
11	Đặt khoanh FOX		
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ấm		
13	Đọc kết quả sau 16-18 giờ		
14	Nhận định kết quả theo CLSI		
15	Trả kết quả		
16	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
17	Rửa tay		
18	Ghi kết quả vào sổ lưu		

**Phụ lục 4. Bảng kiểm quy trình kỹ thuật xác định vi khuẩn sinh ESBL**

STT	Nội dung	Đánh giá	
		Đạt	Không đạt
1	Chuẩn bị nhân viên y tế Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng		
2	Chuẩn bị dụng cụ và trang thiết bị máy móc		
	Chuẩn bị hóa chất		
	Chuẩn bị bệnh phẩm		
3	Kiểm tra đối chiếu mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm hoặc thông tin của người bệnh.		
4	Ghi mã số mẫu hoặc họ tên bệnh nhân		
5	Chọn 4-5 kháng sinh để đặt xác định ESBL (AMC, CAZ, CTX, CRO, FEP...)		
6	Chuẩn bị môi trường MH		
7	Ghi các thông tin lên đĩa môi trường		
8	Pha huyền dịch vi khuẩn		
9	Lấy huyền dịch vào tấm bông vô khuẩn		
10	Ria cây		

11	Đặt khoan kháng sinh đặt AMC ở giữa và 4 khoan còn lại đặt xung quanh theo nguyên tắc khoan cách khoan 2 cm, khoan cách thành 1 cm.		
12	Đặt đĩa KSD ở nhiệt độ phòng và để vào trong tủ ẩm		
13	Đọc kết quả sau 18-24 giờ		
14	Đọc kết quả theo CLSI		
15	Nhận định kết quả		
16	Trả kết quả		
17	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
18	Rửa tay		
19	Ghi kết quả vào sổ lưu		

# HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG GIÁO TRÌNH

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ y tế (2007), Vi sinh y học - Sách đào tạo Cao đẳng xét nghiệm, NXB Y học.
2. Bộ môn Vi Ký sinh, Trường Cao đẳng Y tế Hà Nội (2012), Giáo trình vi sinh tập 1+2, NXB y học.
3. Trường Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh (2014), Giáo trình vi sinh y học. NXB Y học.
4. Bộ Y tế (2008) Vi sinh vật học. NXB Y học.
5. Bộ Y tế (2007) Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng, NXBYH.
6. Bộ môn Vi sinh – ĐHY Hà Nội (2013), Thực tập vi sinh y học, NXBYH.
7. Bộ môn Vi sinh – ĐHY Hà Nội (2010), Vi sinh y học, NXBYH.
8. Lê Huy Chính và CS (2006), Sổ tay vi sinh y học, NXBYH