

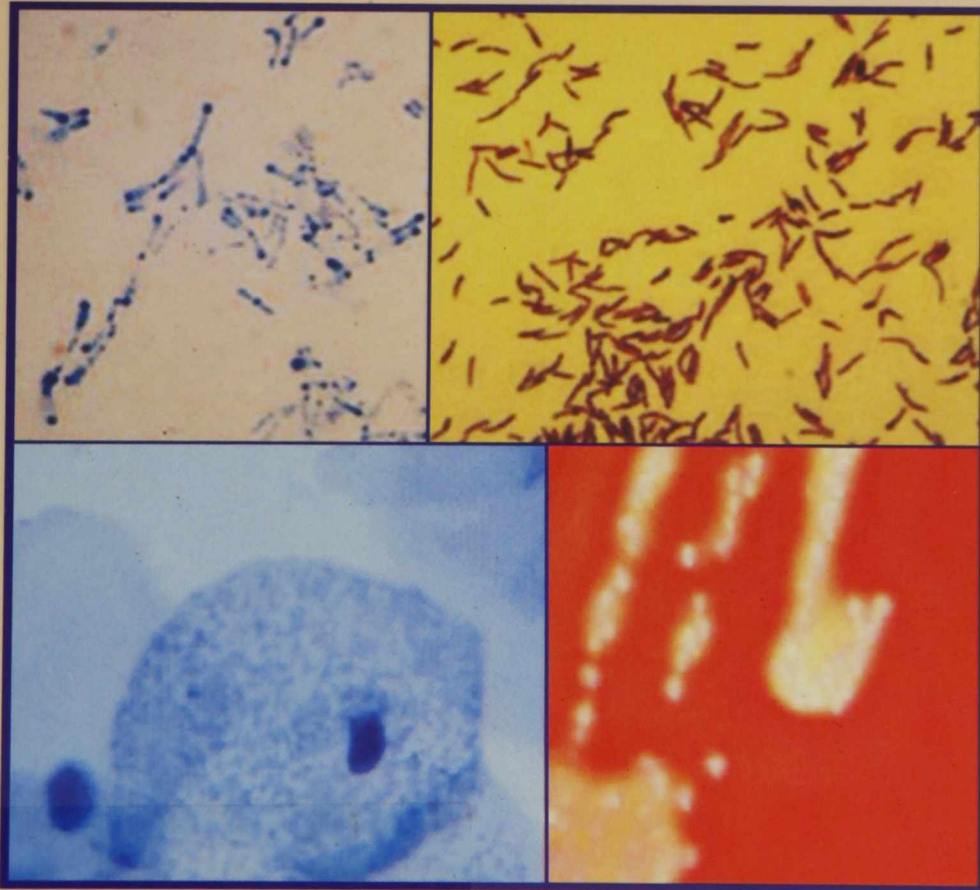
**BỘ Y TẾ**

Cao Đẳng Y tế Phú Thọ



KM.007837

# KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM VI SINH LÂM SÀNG



**NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC**

BỘ Y TẾ

# **KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM VI SINH LÂM SÀNG**

*(Sách dùng Đào tạo Cử nhân Kỹ thuật y học)*

*Mã số: ĐK.01.W.10*

**NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC  
HÀ NỘI - 2006**

**CHỈ ĐẠO BIÊN SOẠN:**

Vụ khoa học Đào tạo – Bộ Y tế

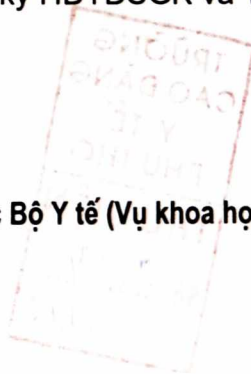
**TÁC GIẢ:**

TS.BS. Phạm Hùng Vân

**THAM GIA TỔ CHỨC BẢN THẢO**

ThS. Phí Văn Thâm và Ban thư ký HĐTĐSGK và TLDH

© Bản quyền thuộc Bộ Y tế (Vụ khoa học và Đào tạo)



## LỜI GIỚI THIỆU

Thực hiện Nghị định 43/2000/NĐ - CP ngày 30/8/2000 của Chính phủ quy định chi tiết và hướng dẫn triển khai luật Giáo dục, Bộ Giáo dục và Đào tạo, Bộ Y tế đã ban hành chương trình khung đào tạo Cử nhân Kỹ thuật y học. Bộ Y tế tổ chức biên soạn bộ tài liệu dạy học các môn học cơ sở và chuyên môn theo chương trình mới nhằm từng bước xây dựng bộ sách chuẩn trong cộng tác đào tạo Cử nhân Kỹ thuật y học.

Sách kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng được biên soạn theo chương trình khung đã được phê duyệt. Năm 2005, cuốn sách này được Hội đồng chuyên môn thẩm định sách giáo khoa và tài liệu dạy học của Bộ Y tế thẩm định. Bộ Y tế thống nhất sử dụng là tài liệu dạy học chính thức của ngành trong giai đoạn hiện nay. Trong thời gian từ 3 đến 5 năm, sách cần được chỉnh lý, bổ sung và cập nhật. Tài liệu được biên soạn gồm 21 bài, 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 Việt Nam. Sách dùng để đào tạo Cử nhân Kỹ thuật y học đồng thời cũng là tài liệu tham khảo tốt cho sinh viên các chuyên ngành khác và các cán bộ y tế quan tâm đến công tác xét nghiệm.

Vụ Khoa học Đào tạo, Bộ Y tế xin chân thành cảm ơn TS.BS. Phạm Hùng Vân các giảng viên Trường Đại học Y Dược TPHCM đã tích cực tham gia biên soạn cuốn sách này. Cuốn sách này được viết lần đầu và đang dần từng bước hoàn thiện nên nội dung biên soạn không tránh khỏi những thiếu sót và cần được bổ sung. Vụ Khoa học và Đào tạo mong nhận được nhiều ý kiến đóng góp của độc giả và đồng nghiệp để cuốn sách này càng hoàn thiện hơn.

**VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO  
BỘ Y TẾ**

## LỜI NÓI ĐẦU

Khác với thử nghiệm sinh hoá và huyết học tại bệnh viện là các thử nghiệm mà ngày hôm nay chỉ có khâu lấy mẫu trên bệnh nhân là phải làm bằng tay còn tất cả các công đoạn còn lại đều có thể thực hiện được trên máy tự động, xét nghiệm vi sinh lâm sàng là một loại xét nghiệm vẫn còn có đa số các bước thực hiện phải làm bằng tay và không chỉ thế là một xét nghiệm đòi hỏi người làm xét nghiệm phải có một kiến thức rất hệ thống và khá toàn diện để có thể quyết định được các bước đi tiếp theo trong tiến trình làm xét nghiệm cho đến khi có kết quả chung cuộc. Ngay cả khi có được kết quả chung cuộc, việc đánh giá và biện luận kết quả như thế nào để hữu dụng nhất cho lâm sàng cũng đòi hỏi người làm xét nghiệm phải có những hiểu biết tối thiểu về khía cạnh vi sinh trong lâm sàng. Chính vì những lý do vậy nên vi sinh lâm sàng là một xét nghiệm cho đến ngày hôm nay có thể nói là chậm phát triển nhất so với các xét nghiệm khác tại các phòng thí nghiệm lâm sàng tại các bệnh viện của chúng ta. Trong lĩnh vực giảng dạy cũng vậy, do sự thiếu thốn các phương tiện và thiết bị nên các kiến thức cũng như thực hành vi sinh lâm sàng được giảng dạy cho các sinh viên cũng còn rất nghèo nàn, chắp vá và thiếu hệ thống; và cũng chính như vậy đã ảnh hưởng thêm đến chất lượng kém cỏi của các xét nghiệm vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện hiện nay.

Với 27 năm kinh nghiệm trong giảng dạy cũng như làm việc trong lĩnh vực vi sinh lâm sàng, tác giả đã cố gắng tổng kết và hệ thống các kiến thức cần thiết nhất và cơ bản nhất để giúp các sinh viên cũng như các nhà vi sinh lâm sàng có thể nắm được khi xây dựng, thực hành các xét nghiệm vi sinh lâm sàng cũng như khi biện luận các kết quả mà các xét nghiệm vi sinh lâm sàng mang lại. Các kiến thức này được trình bày trong nhiều phần, trong đó phần đầu tiên là các kỹ thuật lấy và làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng các bệnh phẩm khác nhau được trình bày trong cuốn sách này, các phần còn lại sẽ liên quan đến việc định danh các vi khuẩn gây bệnh thường phân lập được từ các bệnh phẩm khác nhau và các kỹ thuật kháng sinh đồ thường qui được thực hiện tại các phòng thí nghiệm bệnh viện đang được viết và sẽ được tác giả đưa ra trong một thời gian ngắn sắp tới.

Tác giả luôn cho rằng một nhà vi sinh lâm sàng đứng trước một bệnh phẩm cần phải làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng giống như một bác sĩ điều trị đứng trước một bệnh nhân cần phải được chẩn đoán và điều trị. Bác sĩ cần phải chẩn đoán đúng bệnh mà bệnh nhân đang mắc phải để đưa ra được điều trị đúng và thích hợp cũng giống như nhà vi sinh lâm sàng trước một bệnh phẩm phải đưa ra được một

qui trình xét nghiệm thích hợp để thực hiện theo đúng tiến trình và cuối cùng có một kết quả xét nghiệm vi sinh lâm sàng hữu dụng được cho lâm sàng. Trong các bước xét nghiệm vi sinh lâm sàng phải thực hiện, bước lấy bệnh phẩm và làm các bệnh phẩm là quyết định nhất cho sự thành bại của kết quả xét nghiệm. Chính vì vậy, tác giả hy vọng rằng cuốn các kỹ thuật lấy và làm các bệnh phẩm khác nhau để làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng này sẽ đáp ứng được phần nào yêu cầu của các nhà vi sinh lâm sàng trong nước cũng như các sinh viên khoa kỹ thuật y khoa để xây dựng được cơ sở của các xét nghiệm vi sinh lâm sàng cũng như các phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện của chúng ta hiện nay.

Dĩ nhiên sách cũng không thể nào tránh được các sơ sót về kiến thức, về ngữ pháp, và cả về in ấn. Tác giả chân thành ước mong được nhận sự đóng góp của quý độc giả.

**TS. BS. PHẠM HÙNG VÂN**

## MỤC LỤC

Mẫu máu và cấy máu	7
Các mẫu mủ, chất dịch và cấy mủ, chất dịch	18
Mẫu phân và cấy phân	25
Mẫu nước tiểu và cấy nước tiểu	34
Dịch não tủy	43
Mẫu quét hầu, họng và cấy mẫu quét hầu họng	53
Bệnh phẩm tai, mắt, mũi, xoang và cấy bệnh phẩm tai mắt mũi xoang	59
Đờm, dịch hút đờm qua mũi, dịch hút rửa phế quản qua nội soi và cấy đờm, bệnh phẩm chứa đờm	67
Cấy định lượng mẫu đờm	78
Mẫu bệnh phẩm sinh dục và cấy mẫu lấy từ đường sinh dục	84
Cấy kỵ khí và cấy mẫu bệnh phẩm kỵ khí	92
Khảo sát trực tiếp	101
Nhuộm GRAM	105
Nhuộm METHYLEN BLUE kiểm	109
Nhuộm kháng ACID	111
Thử nghiệm LAL phát hiện ENDOTOXIN (limulus amebocytes lysate)	116
Kiểm tra vi sinh không khí	121
Thử nghiệm huyết thanh học	124
Thử nghiệm hoá miễn dịch học	126
Đánh giá một thử nghiệm dùng để phát hiện một tác nhân gây bệnh	131
Trang bị cơ bản cho một phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng	138
Tài liệu tham khảo	143
Phụ lục A: Bảng tra cứu các sơ đồ và qui trình làm xét nghiệm vi sinh lâm sàng các bệnh phẩm khác nhau	144
Phụ lục B: Bảng tra cứu các hình ảnh minh hoạ	144
Phụ lục C: Bảng tóm tắt các vật liệu lấy mẫu và môi trường phân lập tương ứng cho các bệnh phẩm khác nhau.	145

# BÀI 1. MẪU MÁU VÀ CẤY MÁU

## MỤC TIÊU

1. *Giúp được lâm sàng cho các chỉ định cấy máu thích hợp nhất vì biết được chỉ định cấy máu và thời điểm tốt nhất để thực hiện cấy máu.*
2. *Thực hiện đúng cách xét nghiệm cấy máu vì biết được cách thực hiện cấy máu như thế nào, bao gồm thể tích máu nên lấy để cấy bao nhiêu, nên cấy máu mấy lần?...*
3. *Lựa chọn được phương tiện thích hợp nhất cho cấy máu trong các bệnh viện hiện nay nhờ biết được phương tiện (môi trường) phù hợp nhất để cấy máu.*
4. *Thực hiện tốt qui trình theo dõi cấy máu và cho các kết quả chính xác - kịp thời đến lâm sàng vì biết được qui trình theo dõi cấy máu.*
5. *Biện luận được một cách chính xác kết quả cấy máu vì biết được các vi khuẩn thường gặp trong cấy máu là các vi khuẩn nào? Làm thế nào để có thể nhận biết được một cấy máu dương tính thật sự với một cấy máu dương tính do ngoại nhiễm.*

## 1. CHỈ ĐỊNH CẤY MÁU

- Phải chỉ định cấy máu trước các trường hợp nhiễm trùng có thể có **du khuẩn huyết tạm thời** (transient bacteremia) hay  **nhiễm trùng huyết** (septicemia)...
- Do vậy, nên chỉ định cấy máu trước các bệnh nhân có một trong các triệu chứng như **sốt, ớn lạnh, lạnh run, tiếng thổi tim** (cardiac murmur) nghi ngờ viêm nội tâm mạc, có **xuất huyết ở da hay niêm mạc, xuất huyết dạng sao** (splinter) trên móng tay, choáng.

## 2. THỜI ĐIỂM CẤY MÁU

- Phải cấy máu **trước khi bệnh nhân dùng kháng sinh hệ thống**. Trong bệnh viện, bác sĩ phải cho cấy máu trước khi bắt đầu cho bệnh nhân dùng kháng sinh.
- Tuy nhiên trong các trường hợp bệnh nhân đang điều trị kháng sinh nhưng các triệu chứng của du khuẩn huyết hay nhiễm trùng huyết vẫn không thuyên giảm thì bác sĩ cũng nên cho chỉ định cấy máu để phát hiện tác nhân vi khuẩn gây nhiễm trùng.



- Thời điểm tốt nhất để cấy máu là khi bệnh nhân **bị ớn lạnh** hay **đang lạnh run** trước khi sốt, hay lúc bệnh nhân **đang lên cơn sốt...**
- Có thể cấy máu **2 lần** trong vòng **1 giờ đầu** và thực hiện cấy máu tại 2 vị trí lấy máu khác nhau trên cơ thể (ví dụ: lần đầu lấy máu tay phải thì lần sau lấy máu ở tay trái).

### 3. CÁCH LẤY MÁU ĐỂ CẤY

- Lấy máu tĩnh mạch bằng phương pháp vô trùng (sát trùng da bằng cồn 70%, chờ khô rồi mới chọc kim lấy máu).
- Thể tích máu được lấy để cấy nên chiếm 1/10 hay tối đa là 1/5 thể tích môi trường cấy máu. Thông thường lấy 3-10ml máu để cấy vào môi trường cấy máu có thể tích 50ml. Đối với trường hợp bệnh nhân là trẻ em, lấy khoảng 2-3ml máu để cấy là vừa.

### 4. MÔI TRƯỜNG CẤY MÁU

- BHI, TSB hay Columbia broth, cho vi khuẩn hiếu khí.
- Để cấy kỵ khí, thêm vào môi trường các chất khử như Thioglycollat, L-cystein.
- Để kháng đông, tốt nhất là dùng Sodium Polyanethol Sulfonat (SPS), nếu không có thì dùng citrat hay heparin.

### 5. THEO DÕI CẤY MÁU

- Chai cấy máu được ủ trong tủ ấm 35°C hay 37°C và theo dõi mỗi ngày trong 5-7 ngày xem có dấu hiệu có vi khuẩn mọc hay không trong môi trường cấy máu lỏng, đó là: (1) Có hạt đóng trên mặt hồng cầu, (2) Đục đều hay có màng, (3) Tan huyết, (4) Đông huyết tương, (5) Có gas, (6) Có hạt trắng trong lớp hồng cầu hay mặt lớp hồng cầu.
- Nếu là chai cấy máu có 2 pha thì trước khi ủ và mỗi ngày sau khi quan sát mặt thạch của pha đặc xem có khóm vi khuẩn mọc hay không? Nếu không có khóm vi khuẩn mọc trên pha đặc, tráng pha lỏng lên pha đặc. Có một số vi khuẩn rất dễ bị ly giải sau khi mọc trong môi trường lỏng như *S. pneumoniae*, hay khó mọc thành khóm trên pha đặc như *Streptococci*, do đó nên làm một cấy truyền mù lên mặt thạch (thạch máu hay thạch nâu, sau đó ủ trong tủ ấm CO<sub>2</sub> hay bình nén) sau khi ủ chai cấy máu qua đêm hoặc sau 24 giờ.
- Bất cứ lúc nào phát hiện có dấu hiệu vi khuẩn mọc (trên pha đặc thấy có khóm vi khuẩn mọc, hay trên pha lỏng thấy có một trong các dấu hiệu vi

khuẩn mọc như kể trên) hay nghi ngờ vi khuẩn mọc, tiến hành cấy phân lập ngay, tốt nhất là trên thạch bổ dưỡng nhất là thạch nâu có bổ sung XV (CAXV = Chocolate Agar Isovitex), nếu không có thì cấy trên thạch máu (BA) hay thạch nâu (CA), đồng thời làm một phết nhuộm gram khảo sát trực tiếp. Nếu kết quả nhuộm gram thấy có vi khuẩn, có thể làm kháng sinh đồ trực tiếp từ chai cấy máu. Nếu trên pha đặc có vi khuẩn mọc thì tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ ngay.

- Sau 5 ngày theo dõi chai cấy máu, phải cấy truyền mù một lần nữa để chắc chắn không có vi khuẩn mọc trong chai cấy máu trước khi trả lời cấy máu âm tính.

## 6. CÁC VI KHUẨN HAY VI NẤM THƯỜNG LÀ TÁC NHÂN NHIỄM KHUẨN HUYẾT HAY NHIỄM NẤM HUYẾT

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gram (-)</li> <li>+ <i>Escherichia Coli</i></li> <li>+ <i>Klebsiella spp</i></li> <li>+ <i>Enterobacter spp</i></li> <li>+ <i>Proteus spp</i></li> <li>+ <i>Samonella typhi</i></li> <li>+ <i>Samonella</i> (ngoài <i>S. typhi</i>)</li> <li>+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>+ <i>Neisseria meningitidis</i></li> <li>+ <i>Haemophilus influenzae</i></li> <li>+ <i>Bacteroides fragilis</i></li> <li>+ <i>Brucella spp</i></li> <li>+ <i>Pseudomonas pseudomallei</i></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gram (+) và nấm men</li> <li>+ <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>+ <i>S. epidermidis</i></li> <li>+ <i>S. pyogenes</i> (nhóm A)</li> <li>+ <i>S. agalactiae</i> (nhóm B)</li> <li>+ <i>Streptococci</i> tiêu huyết <math>\alpha</math> (viridans)</li> <li>+ <i>Streptococcus pneumoniae</i></li> <li>+ <i>E. faecalis</i> (nhóm D)</li> <li>+ <i>Listeria monocytogenes</i></li> <li>+ <i>Clostridium perfringens</i></li> <li>+ <i>Peptococcus spp</i></li> <li>+ <i>Peptostreptococcus spp</i></li> <li>+ <i>Candida albicans</i></li> <li>và các nấm men khác</li> </ul> |
|---|---|

## 7. VẤN ĐỀ VI KHUẨN NGOẠI NHIỄM

Các vi khuẩn ngoại nhiễm có thể

- Từ da:
  - + *Staphylococcus epidermidis*,
  - + *Propionobacterium acnès*,
  - + *Diphtheroides*.