

1. Mục đích

Phân lập và xác định tít huyết thanh chủng vi khuẩn tả gây bệnh giúp cho công tác điều trị và phòng chống dịch

2. Phạm vi áp dụng

- Phòng thí nghiệm Vi khuẩn đường ruột – Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương
- Khoa xét nghiệm các Trung tâm Y tế dự phòng và bệnh viện tỉnh Thành phố

3. Nguyên lý

Mẫu bệnh phẩm được cấy vào môi trường tăng sinh píp tôn kiềm và thạch đĩa TCBS chọn lọc. Chọn khuẩn lạc điển hình cấy xác định tính chất sinh vật hóa học. Xác định vi khuẩn tả bằng phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh tả đặc hiệu đa giá *V. cholerae* O1 và O139 và đơn giá Ogawa và Inaba.

4. Trách nhiệm

4.1. Trưởng phòng thí nghiệm:

- Phê duyệt quy trình kỹ thuật
- Ký kết quả xét nghiệm
- Cập nhật các thay đổi của qui trình

4.2. Quản lý chất lượng của Phòng thí nghiệm

- Kiểm soát chất lượng toàn bộ qui trình
- Cập nhật các thay đổi của qui trình

4.3. Nhân viên

- Thực hiện thao tác xét nghiệm chuẩn
- Hoàn tất báo cáo trả lời kết quả xét nghiệm

5. Các từ viết tắt

ATSH	An toàn sinh học
HIA	Heart infusion agar
KIA	Kligler iron agar
LDC	Lysine decarboxylase
TCBS	Thiosulphate - Citrate - Bile salts - Sucrose
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

V. parahaemolyticus *Vibrio parahaemolyticus*

6. An toàn

- Mặc áo choàng, mang găng tay và khẩu trang khi tiếp xúc với các mẫu bệnh phẩm
- Toàn bộ quy trình và thao tác các vật liệu nhiễm trùng cần được thực hiện ở các nơi riêng biệt giảm tối thiểu các hạt nhỏ, khí dung nhiễm trùng.
- Yêu cầu sử dụng tủ ATSH cấp 2
- Lam kính nhuộm vi khuẩn cần được khử nhiễm hoặc sấy khử trùng trước khi vứt bỏ .

7. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

7.1. *Thiết bị, dụng cụ*

7.1.1.1. *Thiết bị*

- Tủ an toàn sinh học cấp 2, điều hòa nhiệt độ
- Tủ ấm 37°C
- Bể nước ủ nhiệt
- Máy ly tâm
- Kính hiển vi, lam kính, lamén, dầu khoáng

7.1.1.2. *Dụng cụ*

- Dụng cụ nuôi cấy vi khuẩn (đèn cồn, que cấy...)
- Găng tay, khẩu trang
- Dụng cụ lấy mẫu (tăm bông vô trùng, chất bảo quản, hộp đựng mẫu, chai sạch, túi nylon sạch)
- Dụng cụ vận chuyển bệnh phẩm (hộp đựng bệnh phẩm, bình tích lạnh, ...)
- Dụng cụ tiệt trùng (nồi hấp, túi đựng chất thải y tế)
- Các dung dịch diệt khuẩn (cloramin B, sodium hypochlorid)

7.2. *Môi trường, hoá chất, thuốc thử*

- Môi trường vận chuyển mẫu
- Nước pepton kiềm
- Môi trường không chọn lọc: thạch TCBS, thạch kiềm
- Môi trường không chọn lọc: thạch tryptoy, thạch não tim, thạch thường
- Các ống môi trường xác định tính chất sinh hóa (KIA, Manitol - di động, Urease - Indol, LDC)

- Môi trường Bacikow có đường arabinose, sucrose và mannose
- Bộ nhuộm Gram, nhuộm xanh methylen
- Thuốc thử Kowac
- Thuốc thử Oxydase
- Kháng huyết thanh tả đặc hiệu đa giá *V. cholerae* O1 và O139
- Kháng huyết thanh tả đặc hiệu đơn giá Ogawa và Inaba

8. Các bước tiến hành

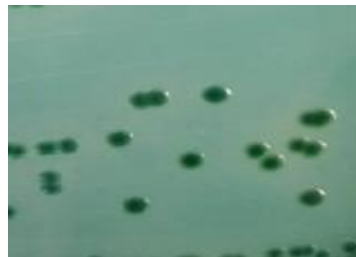
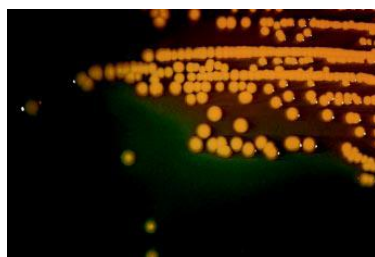
8.1. Tăng sinh trong nước pepton kiềm

Tăng sinh vi khuẩn tả trong nước pepton kiềm làm tăng khả năng phát hiện *V. cholerae*, nhất là trong trường hợp có ít vi khuẩn trong mẫu phân ở giai đoạn hồi phục và mang trùng không triệu chứng. Các Vibrios phát triển rất nhanh trong nước pepton kiềm sau 6-8 giờ nuôi cấy. Lượng mẫu phân cấy trong nước pepton kiềm không nên vượt quá 10% lượng canh thang. Ủ 35⁰C - 37⁰C trong 6 - 8 giờ. Lấy 1-2 vòng que cấy canh khuẩn trên bề mặt ống pepton kiềm cấy chuyển sang môi trường TCBS. Không nên lắc hoặc trộn ống pepton kiềm trước khi cấy chuyển. Tiếp tục cấy chuyển từ ống pepton kiềm thứ nhất sang ống pepton kiềm thứ hai, ủ 35⁰C - 37⁰C trong 6 - 8 giờ. Cấy chuyển từ ống pepton kiềm thứ hai sang môi trường TCBS. Nếu cần thiết, tiếp tục cấy chuyển sang ống pepton kiềm thứ ba.

8.2. Phương pháp phân lập

8.2.1. Nuôi cấy trên môi trường TCBS

Sau 18-24 giờ nuôi cấy ở 35⁰C - 37⁰C, khuẩn lạc nghi ngờ *V. cholerae* màu vàng, sáng, có đường kính 2 - 4mm (Hình 1). *V. cholerae* có màu vàng do lên men đường sucrose. *V. parahaemolyticus* có màu xanh do không lên men đường sucrose. Khuẩn lạc vi khuẩn tả trên môi trường TCBS thường rất dính nên làm phản ứng ngưng kết rất khó.



Hình 1: Khuẩn lạc *V. cholerae* và *V. parahaemolyticus* trên môi trường TCBS

8.2.2. *Xác định tính chất sinh hoá*

Chọn khuẩn lạc nghi ngờ *V. cholerae* từ đĩa môi trường TCBS cấy chuyển sang các môi trường xác định tính chất sinh vật hoá học (Bảng 1)

Kligler iron agar (KIA)

KIA được sử dụng để loại trừ các *Pseudomonas* và vi khuẩn đường ruột khác. Phản ứng của *V. cholerae* trên môi trường KIA: lên men glucose không sinh hơi, không sinh H₂S. Ủ 35° - 37°C trong 18 - 24 giờ. Khi nuôi cấy, nắp các ống làm phản ứng sinh hóa cần để lỏng, đặc biệt là ống KIA.

Manit di động

Dùng que cấy thẳng lấy chủng vi khuẩn cắm sâu vào giữa ống thạch mềm hoặc Manitol - di động. Ủ 37°C/18 - 24 giờ..

- Phản ứng (+): vi khuẩn mọc lan khỏi đường cấy và làm đục môi trường xung quanh
- Phản ứng (-): vi khuẩn chỉ mọc dọc theo đường cấy, môi trường xung quanh vẫn trong.

Urease - Indol

- Phản ứng Urease (+): môi trường chuyển từ màu vàng cam sang màu đỏ tím như màu hoa mừi giờ, Urease (-): môi trường có màu cam không đổi.
- Phản ứng Indol (+): Vòng nhẫn màu đỏ nổi trên bề mặt môi trường, Indol (-): Giữ nguyên màu môi trường

Lysine decarboxylase (LDC)

Sau khi cấy chủng vi khuẩn vào ống môi trường, rỏ 3-4 giọt dầu khoáng hoặc parafin phủ bề mặt môi trường nhằm thúc đẩy sự lên men (môi trường kỵ khí) và phòng kiềm giả trên bề mặt môi trường. Ủ 37°C/24 giờ đến 4 ngày.

- Phản ứng (+): Môi trường trở nên đục và có màu tím
- Phản ứng (-): Môi trường trong và có màu vàng

Lưu ý: Lượng môi trường trong ống không đủ sẽ gây phản ứng âm tính giả.

Bảng 1. Tính chất sinh vật hoá học của *V. cholerae*

Stt	Môi trường	Phản ứng
1	KIA	Kiểm/Axit không sinh hơi (thạch nghiêng màu đỏ/thạch thẳng màu vàng) ^a
2	Di động	(-) âm tính

3	Urease	(-) âm tính
	Indole	(+) or (-)
4	LDC	Kiểm (màu tím) ^b
5	Arabinose	(-) âm tính
6	Manose	(+) âm tính
7	Sucrose	(+) dương tính

a K = kiềm (đỏ); A = axit (vàng);

b K = kiềm (tím); A = axit (vàng); LDC (+): phản ứng kiềm hóa (màu tím)



Hình 2. Phản ứng hóa sinh của *V. cholerae*

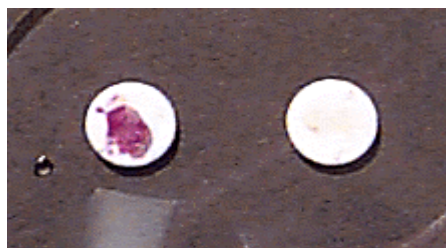
8.2.3. Các thử nghiệm sàng lọc *V. cholerae*

Nhuộm Gram xem hình thể vi khuẩn, soi tươi quan sát vi khuẩn tả di động, phản ứng Oxidase, phản ứng dây là các thử nghiệm sàng lọc *V. cholerae* trước khi làm phản ứng ngưng kết kháng huyết thanh.

Phản ứng Oxydase

Rỏ 2-3 giọt thuốc thử Oxydase lên giấy thấm vô trùng. Lấy một khuẩn lạc từ môi trường thạch nghiêng HIA phết trên giấy đã thấm thuốc thử.

- Phản ứng Oxidase dương tính: màu tím
- Phản ứng Oxidase âm tính: màu không thay đổi



Hình 3. Phản ứng Oxydase (bên trái)

Kết quả phản ứng Oxidase chuyển màu sau 10 giây không có giá trị. Cần kiểm tra chứng dương và chứng âm đồng thời với mẫu thử. Các phẩy khuẩn như: *V. cholerae*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, và *Pseudomonas* có phản ứng Oxydase dương tính; các vi khuẩn đường ruột có phản ứng Oxidase âm tính.

Bảng 2. Các thử nghiệm sàng lọc *V. cholerae*

Thử nghiệm sàng lọc	Kết quả <i>V. cholerae</i>
Nhuộm Gram	Trực khuẩn cong, nhỏ bắt màu Gram âm
Soi tươi vi khuẩn tả dưới kính hiển vi	Trực khuẩn cong, nhỏ di động nhanh như tên bắn
Phản ứng Oxidase	Dương tính

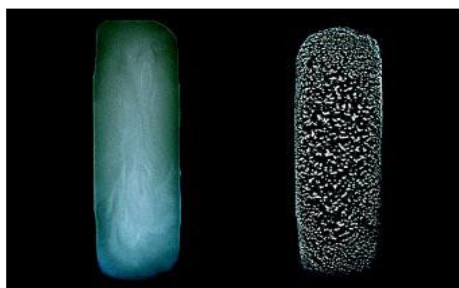
8.2.4. *Chẩn đoán xác định V. cholerae*

Lấy khuẩn lạc nghi ngờ *V. cholerae* từ môi trường thạch không chọn lọc làm phản ứng ngưng kết trên lam kính với kháng huyết thanh đa giá *V. cholerae* O1, O139. Không nên lấy khuẩn lạc từ môi trường TCBS có thể cho kết quả âm tính giả. Nếu chủng vi khuẩn không ngưng kết với kháng huyết thanh O1, tiếp tục làm với kháng huyết thanh O139. Nếu dương tính với kháng huyết thanh đa giá O1 hoặc O139, thông báo kết quả *V. cholerae* O1 hoặc O139. Nếu ngưng kết với kháng huyết thanh đa giá *V. cholerae* O1, tiếp tục làm phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh đơn giá Ogawa và Inaba.

Quy trình làm phản ứng ngưng kết (Hình 5)

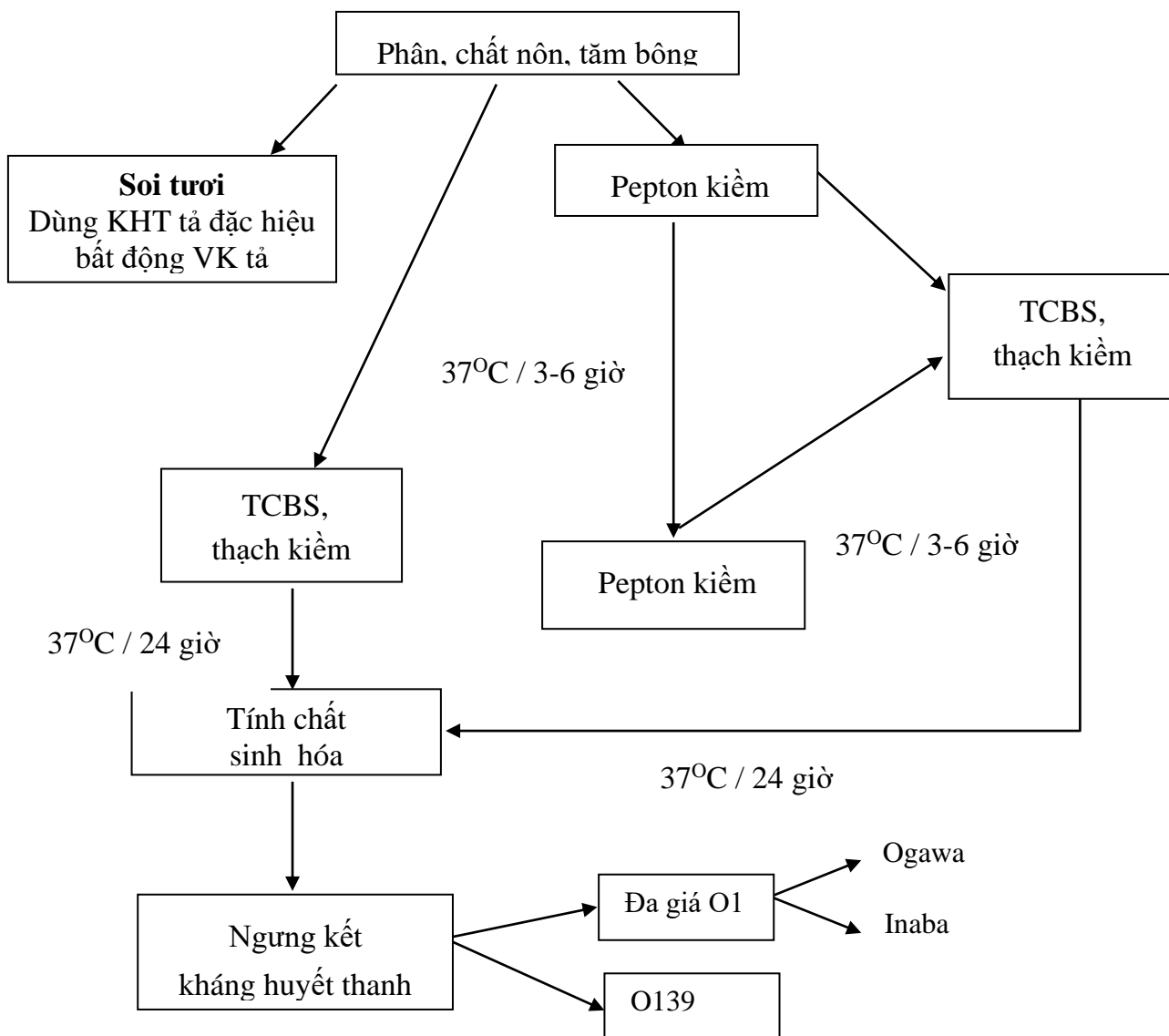
Xác định vi khuẩn bằng phản ứng ngưng kết trên lam kính với kháng huyết thanh đặc hiệu đa giá *V. cholerae* O1, O139. Lấy khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường không chọn lọc như thạch thường hòa vào 2 giọt nước muối sinh lý, trộn đều. Thêm 1 giọt nhỏ kháng huyết thanh vào 1 giọt huyền dịch vi khuẩn. Nên lấy lượng kháng huyết thanh và lượng huyền dịch vi khuẩn tương đương nhau. Trộn đều huyền dịch vi khuẩn và kháng huyết thanh, nghiêng lam kính về phía trước và phía sau nhiều lần, quan sát phản ứng ngưng kết. Nếu phản ứng dương tính, hạt ngưng kết sẽ xuất hiện trong vòng 30 giây đến 1 phút. Kiểm tra huyền dịch vi khuẩn và nước muối không thấy hạt ngưng kết. Nếu hiện tượng tự ngưng kết xuất hiện, khuẩn lạc nuôi cấy ở dạng “xù xì” và không thể xác định tít huyết thanh.

Nếu ngưng kết với kháng huyết thanh đa giá *V. cholerae* O1, tiếp tục làm phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh đơn giá Ogawa và Inaba.



Hình 5. *V. cholerae* ngưng kết với kháng huyết thanh tả đa giá hoặc đơn giá (bên phải). *V. cholerae* không ngưng kết với nước muối (bên trái).

8.3. Sơ đồ tóm tắt quy trình xét nghiệm



8.4. Đọc và phân tích kết quả

Tính chất sinh vật hoá học điển hình của vi khuẩn

Oxydase	+	Urease	-
Glucose	+	Indol	+
Hơi	+	LDC	+
Lactose	-	Arabinose	-
H ₂ S	-	Mannose	+
Manitol / Di động	+/+	Sucrose	+

- Xác định chẩn đoán bằng phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh đa giá *V. cholerae* O1, O139 và đơn giá Ogawa hoặc Inaba
- Đọc kết quả:
Nếu ngưng kết với kháng huyết thanh đa giá *V. cholerae* O1 và đơn giá Ogawa, đọc kết quả như sau:

Vibrio cholerae nhóm O1, týp huyết thanh Ogawa

9. Xử lý mẫu, dụng cụ, chất thải

Phân loại các chất thải sau khi nuôi cấy phân lập vi khuẩn như: mẫu phân, môi trường nuôi cấy vi khuẩn, chủng vi khuẩn và các dụng cụ (pipet, que cấy...)... cần được thu thập và lưu giữ vào đúng nơi quy định. Các chất thải này được sấy khử trùng và thải bỏ.

10. Biểu mẫu

BMKT-VKĐR-05.05.03 Soi tươi vi khuẩn tả

BMKT-VKĐR-05.05.04 Nhuộm Gram

11. Tài liệu tham khảo

1. CDC. Guidelines for specimen collection. 2003.
2. Ewing, W. H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th Edition. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
3. Guidelines on Standard Operating Procedures for MICROBIOLOGY. WHO Regional office for South-East Asia. April 2006.
4. Sack et al., 2004: Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera. *Lancet*. 2004; 363(9404): 223 - 233.

5. Shariful Alam Jilani, Moniruzzaman Chowdhury, Murshed, Zahidul Hasan. Preparing SOP for Microbiology Laboratory: A Short Guideline Bangladesh J Med Microbiol 2007; 01 (01): 25-32.
6. World Health Organization. Manual for the laboratory investigations of acute enteric infections. Geneva: World Health Organization, 1987; publication no. WHO/CDD/83.3 rev 1.