BỆNH VIỆN ĐA KHOA TỈNH LÀO CAI

KHOA HÓA SINH – VI SINH

****

**QUY TRÌNH VI KHUẨN NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH**

**HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG**

**QTKT.NC.35**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Người biên soạn** | **Người xem xét** | **Lãnh đạo bệnh viện phê duyệt** |
| Họ và tên | **BSCKI.Nguyễn Thị Việt Hà** | **BSCKI.Hồ Thị Phi Nga** | **BSCKII. Phạm Văn Thinh** |
| Chữ ký |  |  |  |
|  | **CN.Hoàng Thị Lý** |
| Chữ ký |  |
|  | **KTV.Lê Thị Ánh** |
| Chữ ký |  |
| Ngày ký | 09/08/2023 | 11/08/2023 | 15/08/2023 |
| Ngày có hiệu lực: 16/08/2023 Lần sửa đổi: |
| *Tài liệu nội bộ* |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Logo-Bvlc-BW135** | **QUY TRÌNH VI KHUẨN NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG** | Mã số: QTKT.NC.35Phiên bản số: 1.0 |

**NƠI NHẬN** *(ghi rõ nơi nhận rồi đánh dấu✓vào ô bên cạnh)*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ☑ | Hội đồng khoa học bệnh viện | ☑ | Ban Giám Đốc  | ☑ | Phòng KHTH |
| ☑ | Tổ QLCL | ☑ | Khoa Hóa sinh – Vi sinh |  |  |

**THEO DÕI TÌNH TRẠNG SỬA ĐỔI** (*tình trạng sửa đổi so với bản trước đó)*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Mã tài liệu** | **Nội dung xem xét/ sửa đổi** | **Ngày sửa** | **Người sửa** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

*Tài liệu nội bộ*

**QUY TRÌNH VI KHUẨN NUÔI CẤY VÀ ĐỊNH DANH**

**HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG**

**1. Mục đích**

- Thống nhất và chuẩn hóa kỹ thuật nuôi cấy phát hiện, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong các bệnh phẩm nuôi cấy (máu, đờm, dịch phế quản, dịch cơ thể, nước tiểu, mủ áp xe....bằng hệ thống tự động.

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong khoa Hóa sinh – Vi sinh hiểu và tuân thủ theo quy trình vi khuẩn nuôi cấy và định danh hệ thống tự động từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

**2. Phạm vi áp dụng**

- Quy trình này được áp dụng tại phòng nuôi cấy, labo vi sinh, khoa Hóa sinh – Vi sinh BVĐK tỉnh Lào Cai.

- Thời gian áp dụng: 24h trong ngày, các ngày trong tuần.

**3. Trách nhiệm**

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.

- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.

- Lãnh đạo khoa Hóa sinh – Vi sinh, tổ quản lý chất lượng của khoa có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.

- Tất cả nhân viên khoa Hóa sinh –Vi sinh đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.

- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

**4. Định nghĩa, thuật ngữ và chữ viết tắt**

***4.1. Định nghĩa:*** Không áp dụng

***4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt***

- ATCC: American Type Culture Collection- hệ thống chủng chuẩn của Mỹ.

- BA: Blood agar thạch máu.

- CA: Chocolate agar.

- CFU: Một đơn vị hình thành khóm khuẩn lạc.

- MC: Maconkey agar.

- Uti: Uti agar.

**5. Nguyên lý**

- Kỹ thuật nuôi cấy và định danh vi khuẩn hệ thống tự động **s**ử dụng môi trường đĩa thạch giàu chất dinh dưỡng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn trong các bệnh phẩm đờm, máu, dịch, mủ áp xe...(xem phần tài liệu liên quan). Vi khuẩn sau khi nuôi cấy được ủ ở 35 - 37°C/ 18-24h (thường quy) hoặc 48h - 72h (với vi khuẩn khó mọc).

- Vi khuẩn được định danh dựa vào hình thái học nuôi cấy. Sử dụng các test định danh tính chất sinh vật hóa học cơ bản như Oxidase, Catalase,…. và sinh phẩm xác định tính chất sinh vật, hóa học tự động (card định danh GN, GP, NH,…) trên hệ thống máy Vitek 2 compact để định danh vi khuẩn gây bệnh.

**6. Trang thiết bị và vật tư**

***6.1. Thiết bị***

- Tủ an toàn sinh học cấp II. Mã thiết bị: XN.VK.TB 05 (SN: PCB 12001510085)

- Máy định danh và kháng sinh đồ vi khuẩn Vitek 2 compact. Mã máy : XN.VK.TB01 (SN: VK2 C11875).

- Máy đo độ đục chuẩn McFarland (phụ kiện kèm theo máy vitek 2 compact). Mã máy: XN.VK.TB01.

- Pipet thể tích 145 µL. Mã thiết bị: XN.VK.TB19 (SN: 13523514).

- Pipet thể tích 240 µL. Mã thiết bị: XN.VK.TB20 (SN: 13523615).

- Kính hiển vi quang học. Mã thiết bị: XN.VK.TB 11 (SN 2F32827).

- Máy sấy lam. Mã thiết bị: XN.L.TB02 (SN: SNSD1041L1211).

- Máy lắc. Mã thiết bị: XN.VK.TB17 (SN: 336767).

- Tủ ấm 35-370C. Mã thiết bị: XN.VK.TB09 + XN.VK.TB07 (SN:E24343LH008, E24343LH005).

- Tủ ấm 5 % CO2, nhệt độ 35-37o C. Mã thiết bị: XN.VK.TB06

(SN:E24393L10006).

* 1. ***. Vật tư/ vật liệu***

6.2.1. Dụng cụ

- Trang phục bảo hộ phù hợp.

- Găng tay, khẩu trang, mũ trùm đầu.

- Cồn sát trùng, bút ghi kính, giấy in, panh, kéo, mã code.

- Đầu côn thể tích 0-200 μL, đầu côn thể tích 100-1000 μL.

- Giá đựng mẫu, rack chạy mẫu (kèm theo máy Vitek 2 compact).

- Que cấy kim loại hoặc ăng nhựa.

- Pipet pasteur.

- Ống nhựa chạy máy vitek.

- Ống thủy tinh 5 mL nước muối NaCl 0.9% dùng cho làm kháng sinh đồ phương pháp thông thường.

- Các ống đựng bệnh phẩm, vật liệu lấy mẫu theo đúng quy định của “Sổ tay dịch vụ khách hàng” mã số XN-STDVKH.01.

- Đèn cồn hoặc lò vi đốt.

- Bật lửa.

- Lam kính.

- Bút ghi kính.

- Hộp an toàn.

- Sổ nuôi cấy các bệnh phẩm: (VD: sổ nuôi cấy dịch, nuôi cấy đờm, nuôi cấy máu…).

- Sổ tiến trình nuôi cấy.

- Giá để bệnh phẩm.

6.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Môi trường nuôi cấy: BA, CA, MC, Uti, Muller Hilton .

- Thẻ định danh: GN, GP, NH*...*

- Bộ thuốc nhuộm Gram.

- Nước muối chạy máy Vitek 2 Compact 0.45.

- Nước muối NaCl 0.9%.

- Dầu soi kính.

- Khoanh giấy Oxidase, Optochin, Bacitracin…

- Dung dịch H2O2 30% đối với *Neisseria spp.*

 - Dung dịch H2O2 3% đối với các vi khuẩn khác.

6.2.3. Mẫu bệnh phẩm

- Lấy bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN-STDVKH.01.

- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ từ chối mẫu" mã số XN-BM 5.8.1/03.

**7. Kiểm tra chất lượng**

- Các loại dụng cụ, hóa chất, môi trường nuôi cấy phải được bảo quản theo đúng khuyến cáo của nhà sản xuất và không bị nhiễm bẩn.

- Cácloại sinh phẩm hóa chất, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và trước khi sử dụng phải được tiến hành kiểm tra chất lượng theo ‘‘Quy trình nội kiểm tra chất lượng xét nghiệm’’ mã số XN-QTQL 5.8.5.

- Xét nghiệm được chạy nội kiểm theo Quyết định số 139/BVT/KHTH và theo các quy trình nội kiểm.

 - Xét nghiệm được ngoại kiểm theo ‘‘Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm’’ mã số XN-QTQL 5.8.6.

**8. An toàn**

- Nhiệt độ phòng quy định từ 21°C → 26°C theo QĐ 35/2005/QĐ BYT.

- Độ ẩm ≤ 70%.

- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm xét nghiệm.

- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch cồn 70 độ trước và sau mỗi lần làm việc.

- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn sinh học"mã số XN-STATSH.

- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm, mẫu ngoại kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Hướng dẫn an toàn "mã số XN-QTQL 5.12.2.

- Thực hiện kỹ thuật, bảo hộ lao động theo quy định an toàn sinh học.

- Luôn coi các mẫu bệnh phẩm đến có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.

- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo sổ tay an toàn sinh học.

- Các mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy mẫu theo ‘‘Quy trình lưu và hủy mẫu bệnh phẩm’’ mã số XN-QTQL.5.8.9.

**9. Nội dung thực hiện**

***9.1. Chuẩn bị***

- Kiểm tra máy, kiểm tra hóa chất, vật tư đầy đủ để thực hiện xét nghiệm.

- Đối chiếu thông tin bệnh nhân, mã code với giấy chỉ định trước khi thực hiện xét nghiệm.

- Phòng vi sinh tiếp nhận xử lý mẫu bệnh phẩm càng sớm càng tốt ngay sau khi nhận được mẫu, thời gian xử lý mẫu không quá 30 phút từ sau khi tiếp nhận mẫu bệnh phẩm.

- Vào sổ hành chính (sổ cấy bệnh phẩm Đờm, máu, dịch… ): Mã số (vd: 1 Đ, 2 Đ…), mã bệnh nhân, họ tên, tuổi, khoa, chẩn đoán, ngày cấy.

***9.2. Các bước tiến hành***

- Các thao tác thực hiện trong tủ an toàn sinh học cấp II. Phải hết sức tuân thủ các nguyên tắc an toàn sinh học trước và sau khi xủ lý bệnh phẩm nếu thực hiện ngoài tủ an toàn sinh học.

- Quy trình xét nghiệm vi khuẩn nuôi cấy và định danh hệ thống tự động bao gồm các bước sau:

**Bước 1: Nuôi cấy**

- Các bệnh phẩm được nuôi cấy trên môi trường thích hợp (theo quy trình cấy các bệnh phẩm đờm, dịch, máu…xem phần tài liệu liên quan).

- Ủ đĩa thạch BA, CA đã nuôi cấy ở tủ ấm 5% CO2, 35-370C 18- 24 giờ (thường quy).

- Ủ đĩa thạch MC, Uti, đã nuôi cấy ở tủ ấm thường 35-370C 18-24 giờ

(thường quy).

- Ủ các đĩa thạch nuôi cấy 48h đến 72h với các vi khuẩn khó mọc.

**Bước 2: Nhuộm gram**

- Làm lam nhuộm gram từ bệnh phẩm, tiến hành nhuộm gram theo quy trình QTKT.ST.26.

- Soi lam dưới vật kính 100X, đánh giá sơ bộ bạch cầu, hình thể bắt màu gram của vi khuẩn trên lam nhuộm gram.

+ Nếu kết quả nhuộm soi là trực khuẩn gram âm: Định danh sử dụng card GN.

+ Nếu kết quả nhuộm soi là cầu khuẩn gram dương: Định danh sử dụng card GP.

+ Nếu kết quả nhuộm soi là vi khuẩn dạng song cầu gram âm (nghĩ tới

*N. gonorrhoeae, N. meningitidis*,…) trực khuẩn gram âm đa hình thái (Nghĩ tới *Haemophilus influenza, Hemophilus spp*), cần kết hợp với hình thể khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy, loại bệnh phẩm, bệnh cảnh lâm sàng: Định danh sử dụng card NH.

**Bước 3: Đọc các đĩa thạch sau nuôi cấy**

- Đọc bệnh phẩm: Quan sát khuẩn lạc vi khuẩn trên các môi trường nuôi cấy sau khi ủ ấm đủ thời gian và điều kiện nhiệt độ (xem bước nuôi cấy).

+ Nếu không có khuẩn lạc thuần hoặc khuẩn lạc bị lẫn, tiến hành cấy chuyển sang môi trường thạch máu, thạch chocolate (khi hướng tới vi khuẩn khó mọc như *Haemophilus influenzae* hoặc *Neisseria*…) ủ ấm ở nhiệt độ 35-370C, 5% C02, hoặc tủ ấm thường 35-370C sau 18-24h (thường quy) hoặc 72h (với vi khuẩn khó mọc) sau đó tiến hành các bước định danh vi khuẩn (xem bước 4).

+ Nếu có đủ khuẩn lạc vi khuẩn thuần, tiến hành tiếp bước định danh vi khuẩn tiếp theo.

**Bước 4: Định danh vi khuẩn**

- Chuẩn bị chủng vi sinh vật cần định danh đã thuần theo đúng yêu cầu về môi trường và điều kiện ủ.

- Tùy theo căn nguyên vi khuẩn cần định danh, có thể thực hiện các test thử nghiệm theo các quy trình thử nghiệm tính chất sinh vật hóa học dưới đây, kết hợp với hình thể vi khuẩn, hình thể nhuộm gram, kết quả định danh từ hệ thống tự động bệnh cảnh lâm sàng nhằm định danh vi khuẩn.

+ Thử nghiệm Catalase theo QTKT.NC.27.

+ Thử nghiệm Oxidase theo QTKT.NC.26.

+ Lựa chọn loại thẻ định danh (GN, GP, NH…) cho phù hợp. Thực hiện chạy định danh vi khuẩn theo Quy trình vận hành máy Vitek 2 Compact QTKT.M 01.

**10. Diễn giải và báo cáo kết quả**

- Nếu không có vi khuẩn mọc trên các môi trường nuôi cấy.

+ Trả kết quả: Âm tính sau 48h nuôi cấy (thường quy).

+ Trả kết quả: Âm tính sau 72h nuôi cấy (với vi khuẩn khó mọc).

- Nếu có vi hệ (chủ yếu bệnh phẩm từ đường hô hấp, dịch sinh dục) mọc trên các môi trường nuôi cấy nhưng không phân lập được vi khuẩn gây bệnh.

+ Trả kết quả: Sau 48h nuôi cấy không thấy mọc vi khuẩn gây bệnh (thường quy).

+ Trả kết quả: Sau 72h nuôi cấy không thấy mọc vi khuẩn gây bệnh (với vi khuẩn khó mọc).

- Nếu có vi khuẩn gây bệnh mọc trên các môi trường nuôi cấy.

+ Trả kết quả: Trả tên vi khuẩn gây bệnh tới chi/loài.

- Thời gian trả kết quả: Tùy theo tính chất dễ/khó nuôi cấy của căn nguyên vi khuẩn cần định danh. Kết quả định danh vi khuẩncó thể được trả sau 2-5 ngày sau khi nhận chỉ định nuôi cấy (thường quy) hoặc 2-7 ngày nuôi cấy với vi khuẩn khó mọc hoặc chỉ định nuôi cấy máu.

- Trường hợp nuôi cấy căn nguyên khó mọc, thời gian theo dõi lâu, cần có môi trường sinh phẩm phù hợp đi kèm và có yêu cầu chỉ định cụ thể từ bác sỹ lâm sàng (vd: *Leptospira* 6 đến 10 ngày, *Blucella spp* theo dõi đến 4 tuần....).

**11. Lưu ý**

- Quy trình này áp dụng cho nuôi cấy vi khuẩn hiếu kị khí tuỳ tiện dễ mọc, không áp dụng cho vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.

- Nếu có yêu cầu tìm căn nguyên hiếm gặp, vi khuẩn khó mọc, bác sỹ lâm sàng phải ghi yêu cầu cụ thể.

- Vi khuẩn gây bệnh rất đa dạng và nhiều chủng có tính chất sinh hóa tương tự nhau. Vì vậy, việc định danh vi khuẩn này thường phải kết hợp nhiều phương pháp và đối chiếu với bệnh cảnh lâm sàng để có kết quả tin cậy.

- Các mẫu bệnh phẩm gửi tới phòng xét nghiệm phải đúng thời gian, lấy bệnh phẩm đúng hướng dẫn theo sổ tay dịch vụ khách hàng. Lấy bệnh phẩm không đúng hoặc quá thời gian có thể làm sai lệch kết quả, không nuôi cấy phân lập được vi khuẩn gây bệnh.

**12. Lưu hồ sơ**

- Vào kết quả trên hệ thống mạng bệnh viện.

- Ghi chép đầy đủ kết quả các thử nghiệm và kết quả định danh vào sổ tiến trình nuôi cấy.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại khoa.

**13. Tài liệu liên quan**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **STT** | **Mã quy trình/ biểu mẫu** | **Tên quy trình/ biểu mẫu** |
| 1 | QTKT.M.04 | Quy trình vận hành tủ ATSH cấp II |
| 2 | XN-STATSH | Sổ tay an toàn sinh học |
| 3 | XN-STDVKH.01 | Sổ tay dịch vụ khách hàng |
| 4 | QTKT.ST.26 | Quy trình vi khuẩn nhuộm soi |
| 5 | XN-QTQL.5.12.2 | Hướng dẫn an toàn |
| 6 | XN-QTQL.5.8.9 | Quy trình lưu và hủy mẫu bệnh phẩm |
| 7 | QTKT.NC.27 | Quy trình thử nghiệm catalase |
| 8 | QTKT.NC.26 | Quy trình thử nghiệm oxidase |
| 9 | QTKT.NC.53 | Quy trình nuôi cấy nước tiểu |
| 10 | QTKT.NC.54 | Quy trình nuôi cấy dịch não tủy |
| 11 | QTKT.NC.55 | Quy trình nuôi cấy mủ |
| 12 | QTKT.NC.56 | Quy trình nuôi cấy phân |
| 13 | QTKT.NC.57 | Quy trình nuôi cấy các bệnh phẩm dịch |
| 14 | QTKT.NC.58 | Quy trình nuôi cấy đờm bằng phương pháp bán định lượng |
| 15 | QTKT.NC.59 | Quy trình nuôi cấy các bệnh phẩm dịch sinh dục |
| 16 | QTKT.NC.60 | Quy trình nuôi cấy dịch tỵ hầu |
| 17 | QTKT.NC.61 | Quy trình cấy máu bằng máy cấy máu tự động |
| 18 | QTKT.NC.62 | Quy trình cấy catheter |
| 19 | QTKT.NC.63 | Quy trình nuôi cấy, phân lập và định danh *Pseudomonas aeruginosa* |
| 20 | QTKT.NC.64 | Quy trình nuôi cấy, phân lập và định danh *Acinertobacter baumannii* |
| 21 | QTKT.NC.65 | Quy trình nuôi cấy, phân lập và định danh liên cầu, phế cầu |
| 22 | QTKT.NC.66 | Quy trình nuôi cấy, phân lập và định danh họ vi khuẩn đường ruột |
| 23 | QTKT.NC.67 | Quy trình nuôi cấy, phân lập và định danh *Haemophilus influenza* |
| 24 | QTKT.NC.68 | Quy trình nuôi cấy, phân lập và định danh tụ cầu |
| 25 | QTKT.NC.69 | Quy trình nuôi cấy, phân lập và định danh họ *Neisseria spp* |
| 26 | XN-QTQL 5.8.5 | Quy trình nội kiểm tra chất lượng xét nghiệm |
| 27 | QTKT.M.01 | Quy trình vận hành máy Vitek 2 compact  |

**14. Tài liệu tham khảo**

- Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng, chủ biên PGS.TS.BS Lương Ngọc Khuê NXB Y học. (ban hành kèm theo quyết định số 1539/QĐ – BYT ngày 20/04/2017 của bộ y tế).

- Xét nghiệm vi sinh lâm sàng, chủ biên PGS.TS.Nguyễn Quốc Anh và PGS.TS.Đoàn Mai Phương– NXB y học 2012.

- Hướng dẫn sử dụng sinh phẩm từ nhà sản xuất.