

## HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

**Thuốc thử xét nghiệm tính nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn  
Gram âm không lên men**

**MIC NEFERM**

**Mã sản phẩm:** MLT00046

**Quy cách đóng gói:**

Bộ kit chứa:

- 10 đĩa xét nghiệm
- Nắp đậy (không vô trùng)
- 10 túi PE

**Hạn sử dụng:** 18 tháng

**Cơ sở sản xuất:** Erba Lachema s.r.o

**Địa chỉ:** Karásek 2219/1d, 621 00 Brno, Cộng hòa Séc



**Mã sản phẩm: MLT00046**

**Dùng cho vi sinh**

Bộ kit được thiết kế để kiểm tra tính nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn Gram âm không lên men trên cơ sở xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), nghĩa là nồng độ thấp nhất có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Bộ kit gồm 10 xét nghiệm (10 đĩa). Xét nghiệm dựa trên sự tái hydrat hóa của kháng sinh trong các giếng bằng môi trường canh thang Mueller Hinton II và bổ sung thêm hỗn dịch vi khuẩn. Kết quả được đọc bằng mắt thường hoặc máy đọc kết quả sau 16-20 giờ ủ.

**Kit gồm:**

- 10 đĩa xét nghiệm
- Nắp đậy (không vô trùng)
- 10 túi PE

**Bảo quản và hạn sử dụng của kit:**

Khuyến cáo bảo quản bộ kit ở 2-25°C. Hạn sử dụng được in trên mỗi gói. Cần đặt đĩa ở nhiệt độ phòng tối thiểu 30 phút trước khi mở để tránh ngưng tụ nước. Sau khi mở gói nhôm, không được để đĩa mở mà không có vật che đậy!!! Việc tiếp xúc với độ ẩm không khí có thể làm mất hoạt tính của kháng sinh!!!

**Vật liệu cần để thực hiện xét nghiệm, không được cung cấp kèm theo kit:**

- Dung dịch sinh lý vô trùng (không đệm)
- Môi trường Mueller Hinton II đã điều chỉnh cation (Ví dụ. Suspension medium MIC, mã MLT00070)
- Ethanol
- Ống nghiệm vô trùng
- Thiết bị cấy ErbaDip, mã 50004456
- Đĩa petri vô trùng
- Bồn đựng hóa chất vô trùng 60 ml, mã 50004457
- Pipet hút theo liều (pipet stepper) hoặc pipet đa kênh (multichannel pipette) hút được liều lượng 100 µl
- Pipet hút được liều lượng từ 60-100 µl
- Máy đo độ đục (ví dụ. DENSILAMETER II, mã INS00062)
- Máy ủ tủ ấm 35±2 °C
- Thiết bị phòng thí nghiệm vi sinh thông thường (que cấy vòng, bút đánh dấu, đèn cồn,...)

**Thận trọng:** Bộ kit được dùng cho mục đích chuyên môn! Tuân thủ các quy tắc khi làm việc với vật liệu lây nhiễm!

**Hướng dẫn sử dụng**

**Chuẩn bị hỗn dịch vi khuẩn và cấy (quy trình được khuyến cáo):**

**A) Cấy bằng thiết bị cấy**

- 1) Lấy đĩa ra khỏi túi nhôm và gỡ lớp màng nhôm. Đánh dấu tên loại kit (NEFERM) lên khung để tránh nhầm lẫn khi đọc kết quả sau ủ. Ghi số của chủng kiểm tra lên đĩa. Đổ đầy 100 µl môi trường Suspension medium MIC vào từng giếng.
- 2) Chuẩn bị một ống nghiệm vô trùng chứa 12 ml dung dịch sinh lý. Thêm 100 µl môi trường Suspension medium MIC để giảm sức căng bề mặt.
- 3) Lấy một ít khuẩn lạc từ mê cấy 18 – 24 giờ trên thạch máu và chuẩn bị hỗn dịch vi khuẩn trong dung dịch sinh lý, hỗn dịch phải đạt mật độ bằng 0,5 trên thang McF. Khi chuẩn bị dịch khuẩn của *Pseudomonas spp*, cần chú ý để thu được hỗn dịch mịn có độ đục bằng 0,5 McFarland. Phương pháp tăng sinh có thể dùng để thay thế là: chuyển 3-5 khuẩn lạc vào một ống nghiệm chứa môi trường canh thang thích hợp và ủ đến khi đạt hoặc vượt quá độ đục 0,5 Mc Farland. Sử dụng nước muối vô trùng hoặc canh thang để điều chỉnh độ đục của canh khuẩn đến độ đục tiêu chuẩn 0,5 McFarland.
- 4) Đổ hỗn dịch vi khuẩn vào đĩa petri vô trùng.
- 5) Sử dụng thiết bị cấy vô trùng để cấy đĩa: nhúng thiết bị cấy vào đĩa petri chứa cồn và đốt. Sau đó, nhúng thiết bị cấy đã được làm nguội vào đĩa petri chứa hỗn dịch vi khuẩn đã chuẩn bị. Hỗn dịch vi khuẩn sẽ hình thành lớp màng mỏng bám vào các gai kim loại của thiết bị. Chuyển chủng cấy vào số giếng ở nửa đầu của đĩa bằng cách nhúng thiết bị vào các giếng và trộn cẩn thận. Thực hiện lần nhúng mới vào đĩa petri chứa dịch khuẩn và cấy vào số giếng ở nửa sau của đĩa.

**B) Cấy bằng pipet**

- 1) Chuẩn bị một ống nghiệm chứa 2 ml dung dịch sinh lý.
- 2) Lấy 1 ít khuẩn lạc từ mê cấy 18 – 24 giờ trên thạch máu và chuẩn bị hỗn dịch vi khuẩn trong dung dịch sinh lý, hỗn dịch phải đạt mật độ bằng 0,5 trên thang McF. Khi chuẩn bị dịch khuẩn của *Pseudomonas spp*, cần chú ý để thu được hỗn dịch mịn có độ đục bằng 0,5 McFarland. Phương pháp tăng sinh có thể dùng để thay thế là: chuyển 3-5 khuẩn lạc vào một ống nghiệm chứa môi trường canh thang thích hợp và ủ đến khi đạt hoặc vượt quá độ đục 0,5 Mc Farland. Sử dụng nước muối vô trùng hoặc canh thang để điều chỉnh độ đục của canh khuẩn đến độ đục tiêu chuẩn 0,5 McFarland.
- 3) Lấy 60 µl hỗn dịch vi khuẩn vào ống nghiệm chứa 13 ml môi trường Suspension medium MIC và dàn đều.
- 4) Lấy đĩa ra khỏi túi nhôm và gỡ lớp màng nhôm ra khỏi đĩa. Đánh dấu tên loại kit (NEFERM) lên khung để tránh nhầm lẫn khi đọc kết quả sau ủ. Ghi số của chủng kiểm tra lên đĩa.
- 5) Cấy từng giếng của đĩa với 100 µl hỗn dịch vi khuẩn đã chuẩn bị trong môi trường Suspension medium MIC.

**Lưu ý:** Xử lý đĩa trong vòng 60 phút sau khi lấy ra khỏi túi nhôm.

**Ủ:**

Đặt các đĩa đã cấy vào khung và đưa vào túi PE. Gấp phần đầu mở của túi xuống phía dưới đĩa để tránh bay hơi trong quá trình ủ. Ủ đĩa ở 35 ± 2°C trong 16 – 20 giờ. Đối với các chủng phát triển chậm (ví dụ *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* và *Pseudomonas aeruginosa* từ bệnh nhân xơ nang), nếu không thể đánh giá kết quả MIC thì kéo dài thời gian ủ thêm 20 giờ ở nhiệt độ phòng.

**Đánh giá:**

Lấy đĩa ra khỏi túi PE. Chọn cách thuận tiện nhất để đọc sự phát triển của vi khuẩn trong vi giếng:

- 1) Đọc trên nền xám hoặc dựa theo bố cục đĩa được mô tả trong hướng dẫn sử dụng.
- 2) Đọc dưới ánh sáng phân tán tự nhiên hoặc nhân tạo.
- 3) Không khuyến cáo sử dụng kính lúp.
- 4) Đánh giá xét nghiệm bằng cách dùng máy đọc và phần mềm định danh.

**Chú ý!**

Phải thấy được sự phát triển của vi khuẩn trong giếng đối chứng (giếng K)! Nếu không có dấu hiệu sinh trưởng, KHÔNG THỂ đánh giá xét nghiệm! MIC là nồng độ kháng sinh thấp nhất trong một giếng mà không quan sát thấy sự sinh trưởng của vi khuẩn ở đó. Ngoại trừ: Đối với Trimethoprim/sulfamethoxazol, đọc MIC ở giếng mà vi khuẩn bị ức chế ≥ 80% khi so sánh với giếng chứng vi khuẩn. Cần thận phân biệt các khuẩn vi khuẩn với bọt khí của môi trường. Ghi lại các kết quả.

**Bảng. 1:** Bố cục đĩa: dãy pha loãng các kháng sinh (tính bằng mg/l)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
<b>A</b>	128/64	128	128/4	16	16	16	32	64	16	8	8	4/76
<b>B</b>	64/32	64	64/4	8	8	8	16	32	8	4	4	2/38
<b>C</b>	32/16	32	32/4	4	4	4	8	16	4	2	2	1/19
<b>D</b>	16/8	16	16/4	2	2	2	4	8	2	1	1	0,5/9,5
<b>E</b>	8/4	8	8/4	1	1	1	2	4	1	0,5	0,5	0,25/4,75
<b>F</b>	4/2	4	4/4	0,5	0,5	0,5	1	2	0,5	0,25	0,25	0,12/2,38
<b>G</b>	2/1	2	2/4	0,25	0,25	0,25	0,5	1	0,25	0,12	0,12	0,06/1,19
<b>H</b>	1/0,5	1	1/4	0,12	0,12	0,12	0,25	0,5	0,12	0,06	0,06	K

**Bảng 2: Giá trị breakpoint MIC (điểm nhạy cảm – giới hạn) lâm sàng (mg/l) đối với vi khuẩn Gram âm không lên men dựa theo EUCAST (1)**

Kháng sinh	Viết tắt	<i>Pseudomonas sp.</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>		
		Nhạy cảm S	Trung gian I	Kháng R	Nhạy cảm S	Trung gian I	Kháng R	Nhạy cảm S	Trung gian I	Kháng R
Ampicillin / sulbactam	AMS	-	-	-				IE		IE
Piperacillin	PIP	≤16		≥32				IE		IE
Piperacillin / tazobactam	PIT	≤16/4		≥32/4				IE		IE
Ceftazidime	CAZ	≤8		≥16				-	-	-
Aztreonam	AZT	≤16	-	≥32				-	-	-
Meropenem	MER	≤2	4-8	≥16				≤2	4-8	≥16
Gentamicin	GEN	≤4		≥8				≤4		≥8
Amikacin	AMK	≤8	16	≥32				≤8	16	≥32
Colistin	COL	≤2		≥4*				≤2		≥4
Ciprofloxacin	CIP	≤0,5		≥1				≤0,06	0,12-1	≥2
Tigecycline	TGC	-	-	-				IE		IE
Trimethoprim/sulfamethoxazole	T/S	-	-	-	≤4/76			≥8/152	≤2/38	4/76

\*áp dụng với MIC = 4

Dựa theo ATU (Phạm vi không đảm bảo kỹ thuật), trước khi diễn giải các kết quả cần:

- Lập lại xét nghiệm
- Sử dụng một xét nghiệm thay thế
- Hạ thấp phân loại nhạy cảm
- Đưa độ không đảm bảo vào như một phần của báo cáo

Xem thêm tại [www.eucast.org](http://www.eucast.org)

**Bảng 3: Giá trị breakpoint MIC (Điểm nhạy cảm – giới hạn) lâm sàng (mg/l) đối với vi khuẩn Gram âm không lên men dựa theo CLSI (2)**

Kháng sinh	Viết tắt	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Burkholderia cepacia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>		
		Nhạy cảm S	Trung gian I	Kháng R	Nhạy cảm S	Trung gian I	Kháng R	Nhạy cảm S	Trung gian I	Kháng R
Ampicillin / sulbactam	AMS							≤8/4	16/8	≥32/16
Piperacillin	PIP	≤16	32-64	≥128				≤16	32-64	≥128
Piperacillin / tazobactam	PIT	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4				≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Ceftazidime	CAZ	≤8	16	≥32		16	≥32	≤8	16	≥32
Aztreonam	AZT	≤8	16	≥32						
Meropenem	MER	≤2	4	≥8	≤4 chỉ <i>B. cepacia</i>	8 Chỉ <i>B. cepacia</i>	≥16 chỉ <i>B. cepacia</i>	≤2	4	≥8
Gentamicin	GEN	≤4	8	16				≤4	8	≥16
Amikacin	AMK	≤16	32	≥64				≤16	32	≥64
Colistin	COL	≤2		≥4				≤2		≥4
Ciprofloxacin	CIP	≤0,5	1	≥2				≤1	2	≥4
Tigecycline	TGC									
Trimethoprim/sulfamethoxazole	T/S				≤2/38		≥4/76	≤2/38		≥4/76

Diễn giải:

Các chủng kiểm tra được phân loại là nhạy cảm – trung gian – kháng một loại kháng sinh cụ thể trên cơ sở xác định MIC. Việc phân loại này dựa theo bảng giá trị breakpoint của EUCAST (1) hoặc theo tài liệu M100 của CLSI (2). Ký hiệu "IE" chỉ ra rằng không đủ bằng chứng cho thấy các loài khả nghi là đích nhắm tốt cho việc điều trị bằng kháng sinh cụ thể. Có thể báo cáo kết quả MIC kèm theo lời chú giải mà không có phân loại nhạy cảm (S), trung gian (I) hay kháng (R).

Các tiêu chí diễn giải khác phải được dùng dựa trên các tiêu chuẩn quốc gia và tiêu chuẩn phòng thí nghiệm, ví dụ như tài liệu EUCAST Expert rules (3) hoặc tài liệu M100 (2) và tài liệu M07 (4) của CLSI. Khi diễn giải kết quả, cần xem xét thêm các thông số sau đây: kết quả định danh loài, nguồn gốc của mẫu, bệnh sử của bệnh nhân, hoặc kết quả của các xét nghiệm bổ sung. Chỉ nên đánh giá MIC với các kháng sinh được EUCAST hay CLSI khuyến nghị dùng cho *S. maltophilia* và *B. cepacia*.

**Kiểm soát chất lượng:** Khuyến cáo rằng những chủng đối chứng dưới đây chỉ dùng cho việc nội kiểm tra chức năng của kháng sinh trong phòng thí nghiệm. Cần tuân thủ tiêu chuẩn EUCAST hoặc CLSI khi đánh giá kết quả. Các chủng mới phân lập phải được sử dụng để kiểm tra chất lượng.

CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
-	1-8	1/4-8/4	1-4	2-8	0,25-1	0,5-2	1-4	0,5-4	0,25-1	-	-

  

CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
2/1-8/4	1-4	1/4-4/4	0,06-0,5	0,06-0,25	0,008-0,06	0,25-1	0,5-4	0,25-2	0,004-0,015	0,03-0,25	≤0,5/9,5

  

CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT									
8/4-32/16	>64	0,5/4-2/4									

  

NCTC 13846 <i>Escherichia coli</i> (mcr-1 positive) MIC (mg/l)											
-	-	-	-	-	-	-	-	COL 4* (ngoại lệ 2-8)	-	-	-

\*Giá trị hiệu quả ≥ 90% số chủng phân lập và chỉ đôi khi là 2 hoặc 8 mg/L (nguồn: EUCAST)

ATCC – Ngân hàng chủng chuẩn Hoa Kỳ

CCM – Viện Bảo tàng giống vi sinh vật Séc, Đại học Masaryk, Khoa Khoa học, Kamenice 5, tòa nhà A25, 625 00 Brno, CH Séc. Số điện thoại: +420 549 491 430, Fax +420 549 498 289, <http://www.sci.muni.cz/ccm>, e-mail: [ccm@sci.muni.cz](mailto:ccm@sci.muni.cz)

**Bảo vệ sức khỏe:** Các thành phần của kit không được phân loại là nguy hiểm.

**Thải bỏ vật liệu đã dùng:** Đặt đĩa đã dùng vào bình chứa vật liệu lây nhiễm và hấp khử trùng hoặc đốt nó. Chất thải giấy có thể được tái chế.

**Tài liệu tham khảo:**

- (1) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters, <http://www.eucast.org>
- (2) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI dokument M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- (3) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, <http://www.eucast.org>
- (4) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI dokument M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

KÝ HIỆU ĐÃ DÙNG



Số catalogue



Chẩn đoán in vitro



Nhà sản xuất



Xem hướng dẫn sử dụng



Số lô



Nhiệt độ bảo quản



Hạn sử dụng

