

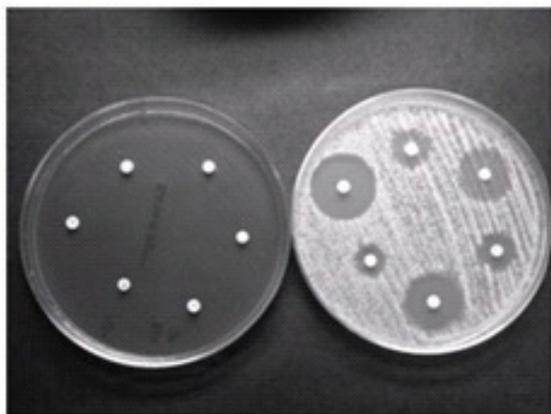
CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ NHẠY CẢM CỦA VI KHUẨN ĐỐI VỚI KHÁNG SINH

Đặng Thị Xuân Thiệp, Võ Thị Trà An
Khoa Chăn nuôi Thú y, Đại học Nông Lâm TP.HCM

Một trong những nhiệm vụ quan trọng của phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng là thực hiện kiểm tra mức độ nhạy cảm của các chủng vi khuẩn với kháng sinh. Mục tiêu của thử nghiệm nhằm đưa ra liệu pháp điều trị bệnh bằng kháng sinh cho từng trường hợp nhiễm trùng cụ thể. Hiện nay, bên cạnh các phương pháp truyền thống như khuếch tán trên thạch hay xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), việc định danh và xác định tính nhạy cảm của vi khuẩn cũng có thể được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán sử dụng que thử kháng sinh E-test hay các hệ thống thương mại Vitek® (bioMérieux), BD Phoenix™, Sensititre™ và Micro-Scan Walk Away® (Thermo Fisher),... Tất cả các phương pháp đều cung cấp các đánh giá định tính/định lượng bao gồm nhạy cảm, trung bình hoặc đề kháng với kháng sinh. Kết quả đánh giá các phương pháp trên được tham chiếu theo tiêu chuẩn của Viện Tiêu chuẩn lâm sàng và phòng thí nghiệm (CLSI, Mỹ), Ủy ban châu Âu về thử nghiệm độ nhạy cảm kháng khuẩn (EUCAST, Anh), Hiệp hội hóa trị liệu kháng khuẩn (BSAC) và Tổ chức tiêu chuẩn hóa quốc tế (ISO, Geneva, Thụy Sĩ). Trong đó, CLSI nổi tiếng với việc phát triển các tiêu chuẩn kiểm tra trong phòng thí nghiệm. Tùy theo từng điều kiện cụ thể về thời gian, nhân lực, chi phí đầu tư trang thiết bị,... của từng phòng thí nghiệm mà sẽ có sự lựa chọn phương pháp cụ thể. Bài viết này tổng hợp các nguyên tắc thực hiện; so sánh ưu, nhược điểm; kết quả một số nghiên cứu có liên quan đến phương pháp định danh/đánh giá mức độ nhạy cảm của các chủng vi khuẩn với kháng sinh.

1. Phương pháp khuếch tán trên thạch (Disk diffusion)

Phương pháp này được công bố bởi Kirby và Bauer vào năm 1960 và được Tổ chức sức khỏe thế giới phát triển thành một quy chuẩn chung trong đánh giá nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Hiện tại, CLSI chịu trách nhiệm cập nhật và sửa đổi quy trình ban đầu của Kirby và Bauer đảm bảo thống nhất toàn cầu. Mục đích của xét nghiệm khuếch tán trên thạch nhằm xác định độ nhạy hoặc đề kháng của vi khuẩn gây bệnh đối với các kháng sinh khác nhau. Vi khuẩn được phát triển trên môi trường thạch Mueller-Hinton (MH) với sự hiện diện của các đĩa giấy tẩm kháng sinh khác nhau. Sự hiện diện hay vắng mặt của các khuẩn lạc xung quanh các đĩa giấy kháng sinh (vòng kháng khuẩn) là kết quả để đánh giá khả năng tác động của kháng sinh đối với vi khuẩn (hình 1). Độ dày tiêu chuẩn của thạch MH là khoảng 4mm. Huyền dịch vi khuẩn trải trên mặt thạch được pha loãng bằng NaCl 0,9% có nồng độ bằng với độ đục chuẩn Mc Farland 0,5 (2×10^8 CFU/ml). Nồng độ này có thể xác định bằng ống Mc Farland 0,5 hoặc bằng máy đo độ đục vi khuẩn. Các đĩa giấy có kích thước 6mm được tẩm kháng sinh ở một nồng độ nhất định được đặt trên môi trường. Không đặt quá 5 đĩa kháng sinh đối với đĩa thạch có đường kính 100mm và không quá 12 đĩa kháng sinh đối với đĩa thạch có đường kính 150mm. Các đĩa được ủ ở điều kiện nhiệt độ, thời gian thích hợp ngay sau khi đặt các đĩa kháng sinh không quá 15 phút. Sau khi ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp cho từng vi khuẩn, bước tiếp theo là xác định kích thước vòng vô khuẩn xung quanh đĩa kháng sinh và so sánh với bảng tiêu chuẩn được đề nghị bởi CLSI để kết luận mức độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh (CLSI, 2015).



Hình 1. Kết quả 1 thử nghiệm tính nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh bằng khuếch tán trên thạch (Ingroff, 2006)

Hiện tại, đây là phương pháp phổ biến nhất trong kiểm tra tính nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh. CLSI cung cấp nhiều phiên bản về phương pháp thực hiện cũng như tiêu chuẩn đánh giá tính nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh như M31-A2, M100-S26 hay VETS08. Trong thú y, phiên bản CLSI VETS08 cung cấp tiêu chuẩn đánh giá cho hầu hết các nhóm vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí, thậm chí là các vi khuẩn khó nuôi cấy (fastidious bacteria). Tuy nhiên, số lượng kháng sinh được cung cấp điểm tới hạn, breakpoint để đánh giá tính nhạy cảm của vi khuẩn đối với kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch còn hạn chế. Ví dụ, trong nhóm vi khuẩn gây bệnh hô hấp trên heo, để đánh giá tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *Bordetella bronchiseptica* đối với kháng sinh thì CLSI VETS08 chỉ cung cấp tiêu chuẩn đánh giá cho một số kháng sinh như ampicillin, tulathromycin, tildipirosin, florfenicol, trong đó chỉ có tulathromycin và florfenicol được cung cấp breakpoint để đánh giá tính nhạy cảm của *Bordetella bronchiseptica* bằng phương pháp khuếch tán trên thạch.

Phương pháp này đã được ứng dụng rất rộng rãi trong đánh giá mức độ nhạy cảm kháng sinh của nhiều vi khuẩn phân lập từ động vật, kể cả các vi khuẩn khó nuôi cấy như *P. multocida* (Furian và ctv, 2016; Habrun và

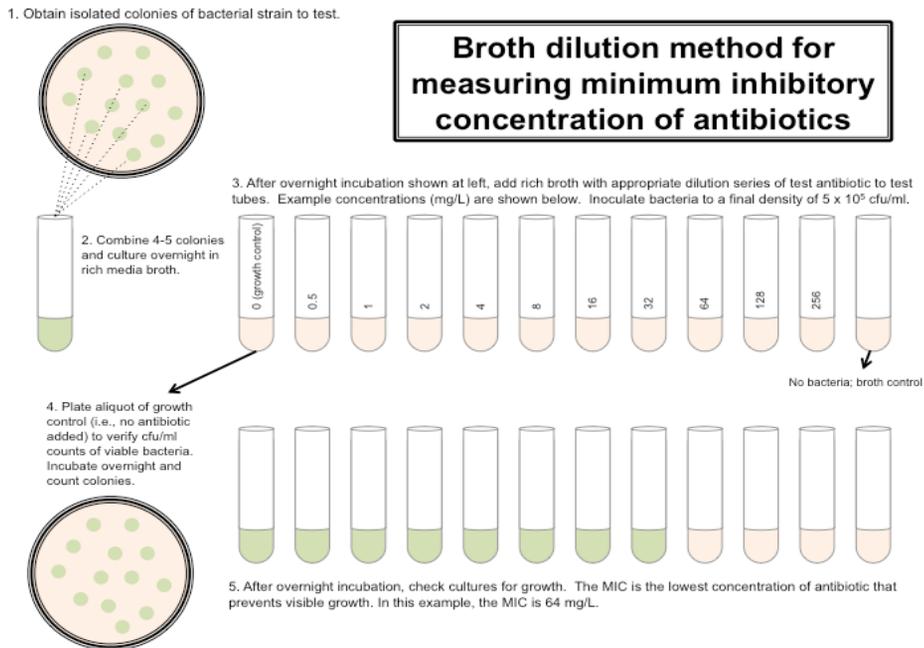
ctv, 2010); *A. pleuropneumoniae* (Kim và ctv, 2016; McDermott và ctv, 2001), và một số vi khuẩn khác như *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. suis* (Habrun và ctv, 2010); *H. parasuis* (Dayao và ctv, 2014) hay *B. bronchiseptica* (Kadlec và Schwarz, 2018).

2. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC-minimum inhibitory concentration)

Phương pháp này được thực hiện bằng cách pha loãng kháng sinh theo dãy nồng độ trong các ống nghiệm (broth macrodilution) hoặc trên khay vi pha loãng có 96 giếng (broth microdilution) hoặc trên đĩa thạch (agar dilution). Dung dịch Mueller-Hinton điều chỉnh cation (Cation-adjusted Mueller-Hinton broth - CAMHB) được đề nghị sử dụng trong phương pháp này. Khuẩn lạc thuần từ môi trường không chọn lọc được cho vào canh đạt nồng độ Mc Farland 0,5; một phần canh được pha loãng 1:100 với canh gốc hoặc NaCl 0,9% để đạt 5×10^5 CFU/ml. Canh pha loãng vi khuẩn tiếp tục cho vào ống/khay môi trường CAMHB có chứa kháng sinh pha loãng theo dãy nồng độ. Việc bổ sung các thành phần vào môi trường canh có thể thực hiện thủ công bằng pipet có 1 hoặc nhiều đầu hay các hệ thống hỗ trợ tự động như Sensititre AIM™ (ThermoFisher). Các ống/khay được ủ ở 35°C từ 16 đến 20 giờ trước khi xác định MIC. Nồng độ thấp nhất ức chế hoàn toàn sự phát triển của sinh vật được ghi nhận qua quan sát bằng mắt thường đó chính là nồng độ ức chế tối thiểu (hình 2). CLSI cung cấp các tiêu chuẩn diễn giải MIC của từng loại kháng sinh với vi khuẩn (CLSI, 2015). Ưu điểm của kỹ thuật này là tạo ra kết quả định lượng. Nhược điểm của phương pháp này là công việc thủ công, tẻ nhạt, có khả năng sai sót trong việc chuẩn bị các dung dịch kháng sinh, lượng thuốc thử tương đối lớn và không gian cần thiết cho mỗi thử nghiệm. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu được xem là tiêu chuẩn vàng trong đánh giá sự mẫn cảm của vi khuẩn đối với kháng sinh (Schumacher và ctv, 2018). Nhiều nghiên cứu đã thành công trong việc ứng dụng kỹ thuật này để xác định sự mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn phân lập từ động

vật, đặc biệt là nhóm vi khuẩn khó nuôi cấy như các vi khuẩn gây bệnh hô hấp trên heo. Trong đó, nhiều nghiên cứu liên quan đến sử dụng phương pháp MIC để đánh giá mức độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* (Habrún và ctv, 2010; Fuente và ctv, 2007; Kucerova và ctv, 2012; Dayao và ctv, 2014; Dayao và ctv, 2016; McDermott và ctv, 2001); *P. multocida* (Nedbalcová và Kučerová, 2013; Oh và ctv 2018; Dayao và ctv, 2014; Dayao và ctv, 2016; El Garch và ctv, 2016); *H. parasuis* (Nedbalcová và

Kučerová, 2013; Prüller và ctv, 2017; Aarestrup và 2004; Brogden và ctv, 2018; El Garch và ctv, 2016), *B. bronchiseptica* (Kadlec và Schwarz, 2018; Prüller và ctv, 2015). Năm 2020, nghiên cứu của chúng tôi cũng đã thành công trong việc đánh giá mức độ mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *P. multocida* và *B. bronchiseptica* phân lập từ mẫu phổi và dịch mũi heo bằng phương pháp MIC (Đặng Thị Xuân Thiệp và ctv, 2020).



Hình 2. Thực hiện MIC trong ống nghiệm (Tankeshwar, 2013)

Phương pháp pha loãng trên thạch (agar dilution) xác định tính nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh bằng cách đưa kháng sinh vào môi trường thạch, với mỗi đĩa thạch chứa một nồng độ kháng sinh khác nhau. Môi trường MHA được sử dụng cho vi khuẩn thông thường hoặc bổ sung 5% máu cừu đối với vi khuẩn khó mọc. Kháng sinh được pha loãng theo tỷ lệ 1:2, 1:4 và 1:8, tiếp đến cho kháng sinh đã pha loãng vào thạch đang giữ nóng ở 50°C bằng bể cách thủy (water bath) theo tỷ lệ 1:9. Độ dày đĩa thạch từ 3-4mm. Nồng độ huyền dịch vi khuẩn cần chuẩn bị là 10⁴ CFU/ml trong NaCl 0,9%. Huyền dịch vi khuẩn sau đó được dàn lên bề

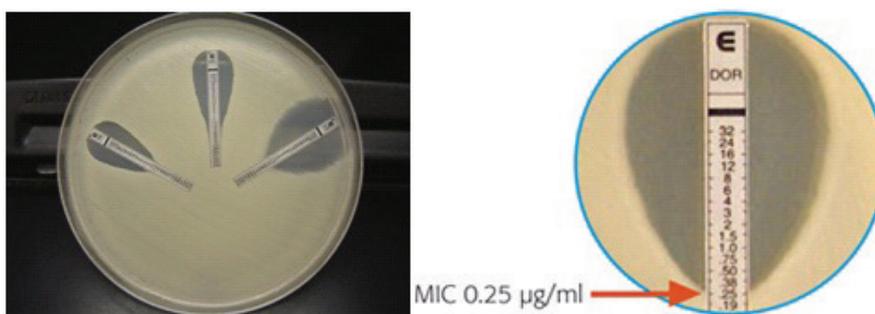
mặt đĩa thạch bằng que cấy hoặc pipet tại các vị trí đã được đánh dấu. Để yên các đĩa ở nhiệt độ phòng cho đến các giọt huyền dịch vi khuẩn ngấm vào thạch, bề mặt đĩa khô ráo. Sau cùng cho đĩa vào tủ ẩm ủ ở nhiệt độ 35°C ± 2°C trong 16–20 giờ. Đọc kết quả MIC bằng cách đặt các đĩa trên bề mặt tối, không phản chiếu. Giá trị MIC là nồng độ thấp nhất của chất kháng khuẩn có tác dụng ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi khuẩn mà không có sự xuất hiện của bất cứ một khuẩn lạc đơn lẻ nào hoặc một vết mờ do huyền dịch vi khuẩn tạo nên (CLSI, 2015). Các phiên bản CLSI M100-S26, M31-A2 hay VETS08 cung cấp đầy đủ breakpoint để đánh giá mức

độ nhạy cảm của vi khuẩn với các kháng sinh đề nghị thử nghiệm bằng phương pháp MIC. Đây là điểm thuận lợi của phương pháp MIC so với phương pháp khuếch tán trên thạch về mặt tiêu chuẩn đánh giá. Kháng sinh thử nghiệm cần được cung cấp từ các hãng nổi tiếng, làm cho kết quả đáng tin cậy nhưng chi phí cho những kháng sinh này là khá lớn. Phiên bản CSLI VETS08 đề nghị các kháng sinh sử dụng trong đánh giá sự nhạy cảm của các vi khuẩn gây bệnh trên heo bao gồm ceftiofur, tildipirosin, tilmicosin, tulathromycin, ampicillin, penicillin, florfenicol, tiamulin, enrofloxacin, tetracycline, gentamicin, clindamycin, sulfonamides, erythromycin, apramycin, spectinomycin, cefquinome, tylosin, amikacin, sulfamethoxazole/trimethoprim, tylvalosin, valnemulin. Các kháng sinh cần được cung cấp bởi các công ty Zoetis, Bayer Health Care LLC, Merck Animal Health, Merial và Elanco Animal Health (CSLI, 2018).

3. Phương pháp khuếch tán theo nồng độ (E-test, Epsilonometer test)

Phương pháp khuếch tán theo nồng độ, gọi tắt là E-test, là phương pháp xác định độ nhạy của vi sinh vật với kháng sinh bằng cách đặt một dải nhựa tẩm kháng sinh theo nồng độ lên đĩa thạch. E-test là một hệ thống độc quyền được sản xuất bởi bioMérieux. Kỹ thuật này cung cấp kết quả định lượng trực tiếp về tính nhạy cảm kháng sinh của vi sinh vật. Que thử E-test là một dải nhựa với phân bố 15 nồng độ kháng sinh ở một mặt và được in thang đo MIC ở mặt

còn lại của que thử. Nguyên tắc của E-test là kết hợp phương pháp pha loãng và khuếch tán trên thạch để kiểm tra tính nhạy cảm. Kháng sinh từ que thử E-test được giải phóng từ bề mặt que thử vào bề mặt thạch. Sau khi ủ, sự phát triển của vi khuẩn trở nên rõ ràng, hình elip ức chế đối xứng dọc theo dải được nhìn thấy. E-test được lấy ra khỏi tủ đông -20°C và giữ ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thí nghiệm. Pha loãng một số khuẩn lạc của gốc vi sinh vật thử nghiệm trong NaCl 0,9%. Vortex trong 15 giây. Điều chỉnh độ đục huyền dịch theo tiêu chuẩn Mc Farland 0,5. Đối với các sinh vật nhạy, điều chỉnh huyền dịch theo tiêu chuẩn Mc Farland 1. Nhúng tấm bông vô trùng vào huyền dịch và loại bỏ dịch thừa bằng cách ấn vào thành trong của ống nghiệm. Dùng tấm bông phết huyền dịch vi khuẩn toàn bộ bề mặt thạch theo 3 hướng bằng cách xoay đĩa 60° trên môi trường Mueller Hinton Agar (MHA). Để khô mặt thạch trong 5-15 phút trước khi đặt que thử E-test lên mặt thạch. Đặt que thử E-test lên đĩa thạch có thang đo MIC hướng lên trên và nồng độ tối đa gần vành đĩa nhất. Có thể đặt 1-2 que thử E-test trên đĩa thạch có đường kính 90 mm hoặc 4 - 6 que trên đĩa thạch 150 mm. Điều kiện ủ đối với *Haemophilus* là ở 5% CO_2 , 35°C trong 18 giờ; *Streptococcus pneumoniae* ủ ở 5% CO_2 , 35°C trong 20-24 giờ; *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* và các vi khuẩn khác ủ ở điều kiện hiếu khí 35°C trong 24 giờ. Sau khi ủ, quan sát vùng ức chế và đọc kết quả.



Hình 3. *S. aureus* trong thử nghiệm E-test với kháng sinh vancomycin (VA), aptomycin (DM), and linezolid (LZ) (Kim và ctv, 2016)

Giá trị MIC được xác định tại vị trí mà hình elip giao với thang đo/ que thử E-test (hình 3). Nếu giá trị MIC giữa 2 độ pha loãng của thang đo thì lấy giá trị cao hơn. Nếu giao điểm khác nhau ở hai bên của dải, đọc kết quả MIC là giá trị lớn hơn. Diễn giải kết quả MIC là nhạy cảm, trung bình hoặc kháng. Ưu điểm của phương pháp này dễ thực hiện, dễ dàng nhận thấy sự vấy nhiễm trên môi trường nuôi cấy, có thể dễ dàng thiết lập cho một số lượng nhỏ các gốc vi sinh vật được phân lập trên lâm sàng. Tuy nhiên, kết quả có thể bị ảnh hưởng bởi pH đĩa thạch, chất lượng kháng sinh được tẩm vào dải, quá trình bảo quản, điều kiện ủ; giá thành cao.

Như vậy, phương pháp này có thể ứng dụng để đánh giá mức độ mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn được phân lập từ nhiều loài khác nhau. Tuy nhiên, có thể do chi phí cho que thử E-test còn cao nên hiện tại chúng tôi ghi nhận hầu hết các nghiên cứu sử dụng E-test trong đánh giá mẫn cảm kháng sinh chủ yếu là các vi khuẩn được phân lập từ nhân y. Một nghiên cứu cho thấy nhiều chủng *H. pylori*, *N. gonorrhoeae*, *Enterococcus* spp., và nhiều chủng phân lập lâm sàng khác đã được kiểm tra bằng E-test và so sánh với các phương pháp tiêu chuẩn khác, kết quả tương quan tốt trong khoảng 91% - 99% (Glupczynski và ctv, 1991; Van Dyck và ctv, 1994). Gần đây, các gốc *S. aureus* nhạy cảm với methicillin (MSSA) và *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) đã được kiểm tra bằng E-test để xác định MIC của ceftaroline. Kết quả được so sánh với phương pháp pha loãng vi sinh trong canh thang (BMD) và cho thấy sự tương quan rất cao, hơn 95% (Cantón, 2017). Nhiều gốc *Campylobacter* spp. cũng được E-test đánh giá để xác định khả năng kháng thuốc (Hariharan, 2009). Tất cả những kết quả này đã chứng minh độ tin cậy và tầm quan trọng của E-test, đặc biệt đối với vi khuẩn phát triển chậm như *C. jejuni*, *H. pylori* và vi khuẩn khó tính hiếm gặp như *S. pneumoniae* và *Neisseria* spp. (Khan và ctv, 2019).

4. Một số hệ thống tự động và các kỹ thuật tiềm năng trong định danh và đánh giá mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn

4.1. Các hệ thống vi pha loãng tự động

Hiện nay, phương pháp vi pha loãng được thực hiện tự động bằng các hệ thống thương mại hoá như Vitek[®], BD Phoenix[™], Sensititre[™] và Micro-Scan Walk Away[®]. Các hệ thống này thực hiện tự động định danh và đánh giá mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn dựa trên nguyên tắc chung đánh giá sự phát triển của vi khuẩn trong môi trường vi pha loãng có kháng sinh được chứa trong các tấm vi giếng sau thời gian ủ. Các hệ thống trên cung cấp kết quả định danh vi khuẩn và đánh giá mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn một cách nhanh chóng, giúp đưa liệu pháp kháng sinh kịp thời, tăng hiệu quả điều trị bệnh nhiễm trùng. Các phương pháp này cũng giúp tiết kiệm thời gian, giảm các bước thực hiện thủ công do chỉ cần thực hiện bước phân lập thuần vi khuẩn. Tuy nhiên, phương pháp định danh và đánh giá mẫn cảm kháng sinh của mỗi hệ thống là khác nhau sẽ được trình bày dưới đây.

* Vitek[®]

Hệ thống này được phát triển vào những năm 1970 bởi bioMérieux (Pháp). Các hệ thống hiện tại trên thị trường là Vitek[®]2 compact và Vitek[®]2. Hệ thống sử dụng “thẻ AST” (hình 4) chứa các giếng siêu nhỏ có kết nối chất lỏng để tự động chiết mẫu vào nhiều giếng đồng thời. Mỗi thẻ chứa 64 giếng nhỏ được nạp môi trường nuôi cấy và kháng sinh ở các nồng độ khác nhau. Thẻ cũng bao gồm một giếng chỉ chứa môi trường nuôi cấy mà không có bất kỳ kháng sinh nào, được sử dụng như giếng đối chứng dương. Đây là một hệ thống hoàn toàn tự động dựa trên nguyên tắc suy giảm ánh sáng được đo bằng máy quét quang học để phát hiện khả năng phát triển vi khuẩn. Vi khuẩn mẫn cảm nghĩa là bị kháng sinh ức chế thì mật độ quang học càng nhỏ. Các giá trị MIC được xác định dựa trên quan sát quang học về sự phát triển của vi khuẩn

trong các giếng riêng lẻ. Kết quả MIC với các kháng sinh khác nhau được hệ thống tạo ra và báo cáo thành kết quả cuối cùng nhạy cảm,

trung gian, đề kháng. Hệ thống Vitek® có thể xử lý 120 thẻ với hệ thống XL và 15/30/60 thẻ với hệ thống Vitek® Compact.



Hình 4. Hệ thống Vitek® 2 compact (bioMérieux, 2020)

* BD Phoenix™

BD Phoenix™ là một hệ thống phát triển bởi Becton, Dickinson Company (Mỹ), được Cục Quản lý thực phẩm và dược phẩm (FDA) phê duyệt. Phương pháp này sử dụng chất chỉ thị oxy hóa khử để phát hiện sự phát triển của các sinh vật trong các tấm vi giếng (Carroll, 2006). Mỗi giếng vi sinh chứa một kháng sinh ở một nồng độ cụ thể được bù nước bằng cách bổ sung huyền dịch vi khuẩn. Các tấm này được ủ trong một khoảng thời gian và được quét xác định vi khuẩn tăng trưởng bằng cách sử dụng chất

tạo màu hoặc chất tạo fluor. Vi khuẩn miễn cảm nghĩa là bị kháng sinh ức chế thì chỉ thị oxy hóa khử càng ít. Mỗi bảng điều khiển chứa một phần ID (định danh) và một phần AST (mẫn cảm kháng sinh), mỗi phần có nhiều vi giếng (hình 5). Phần AST của bảng bao gồm 84 giếng trong đó có 1 giếng đối chứng dương. Hệ thống BD Phoenix™ có khả năng đọc 99 bảng AST và có một hệ thống phần mềm chuyên dụng để báo cáo giá trị MIC. Hệ thống này mất từ 4-16 giờ để thu được giá trị MIC tùy thuộc vào loại vi sinh vật.

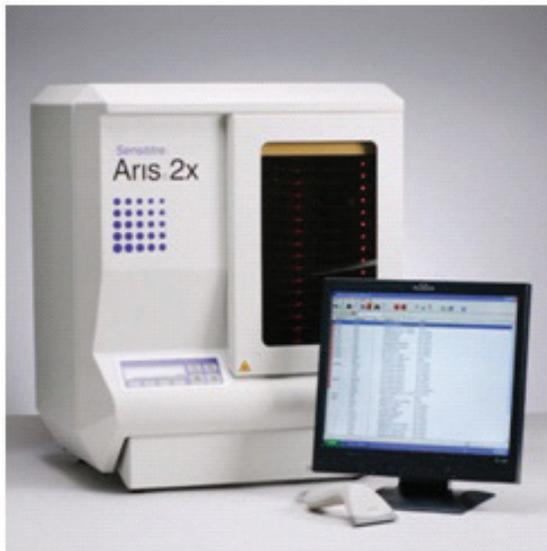
BD PHOENIX M100



Hình 5. Hệ thống BD Phoenix™ và vật liệu kèm theo (Becton Dickinson, 2020)

* Sensititre™

Đây là hệ thống được phát triển bởi Thermo Fisher Scientific (Mỹ). Hệ thống sử dụng công nghệ huỳnh quang để theo dõi hoạt động của các enzyme cụ thể do sinh vật tạo ra trong thời gian ủ. Các enzyme do vi khuẩn tạo ra sẽ phân cắt liên kết giữa fluorophore và chất nền, điều này làm giải phóng fluorophore để phát huỳnh quang (Belak, 2001). Lượng huỳnh quang liên quan trực tiếp đến sự phát triển của sinh vật và là cơ sở để đánh giá MIC. Vi khuẩn mẫn cảm nghĩa là bị kháng sinh ức chế thì mức độ phát triển càng ít. Hệ thống hoàn toàn tự động, có khả năng xử lý nhiều mẫu cùng lúc và thời gian thu kết quả từ 18-24 giờ (hình 6). Hệ thống này cho phép các đĩa có thể tùy chỉnh với nhiều kháng sinh trên một định dạng duy nhất, do đó cho kết quả nhanh chóng.

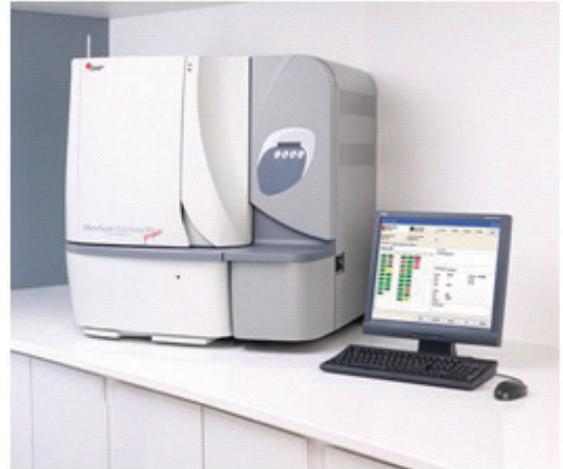


Hình 6. Hệ thống Sensititre™ Aris 2X (Thermo Fisher Scientific, 2020)

* Micro-Scan Walk Away®

Hệ thống này được phát triển bởi Beckman-Coulter (Mỹ). Hệ thống có thể ủ và phân tích kết quả từ 40 – 96 khay vi pha loãng. Phương pháp này cho phép đọc so màu dựa trên việc phát hiện độ đục để đánh giá sự phát triển của vi khuẩn trong giếng. Mỗi giếng chứa kháng sinh khô cùng với môi trường, được hòa tan bằng cách đưa huyền dịch vi

khuẩn và ủ để xác định sự phát triển của vi khuẩn trong các giếng riêng lẻ (hình 7). Nồng độ ngưỡng phát hiện vi khuẩn trong hệ thống này là 2×10^7 CFU/ml. Việc xác định mẫn cảm kháng sinh cho các sinh vật phát triển nhanh có thể từ 4 - 7 giờ và khoảng 18 giờ đối với các sinh vật phát triển chậm.



Hình 7. Hệ thống Micro-Scan Walk Away® (Beckman-Coulter, 2020)

4.2. Các hệ thống công nghệ vi sinh mới

Gần đây, một số hệ thống tự động công nghệ vi sinh mới cho phép định danh và đánh giá mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn dựa trên kiểu hình. Các hệ thống này cho phép xác định các đặc điểm kiểu hình của vi khuẩn, bao gồm sự phát triển, khả năng tồn tại, hình thái và sự trao đổi chất trực tiếp từ các mẫu bệnh phẩm mà không cần thực hiện bước phân lập vi khuẩn thuần. Đặc biệt, việc “nhốt” vi khuẩn ở thể tích nhỏ, rời rạc ở cấp độ đơn bào trong các thiết bị vi lỏng có khả năng đẩy nhanh các phản ứng sinh hóa và sự phát triển của vi khuẩn, làm cho nồng độ phát triển vi khuẩn trong môi trường phân lập đạt đến mức có thể phát hiện nhanh hơn so với các phương pháp khác. Do đó, các hệ thống này đại diện cho các phương pháp thay thế hấp dẫn đối với các xét nghiệm kiểu hình thông thường do giảm thời gian lấy mẫu, đơn giản, di động và quan trọng là khả năng phân tích đơn bào. Dưới đây là một số công nghệ mới đã được thương mại hoá.

* Phương pháp nuôi cấy vi pha lỏng (microfluidic device-based culture methods)

Phương pháp này phân tách các vi khuẩn riêng lẻ bằng cách sử dụng mô hình ngẫu nhiên giam giữ vi khuẩn thành các giọt nano, nơi vi khuẩn phát triển và xác định sự phát triển của vi khuẩn bằng cách đo chỉ số resazurin. Resazurin là chất được khử thành resorufin bởi quá trình hô hấp hiếu khí của các hoạt động chuyển hóa tế bào. Resazurin là chất chỉ thị về khả năng sống của tế bào (Anoopkumar và ctv, 2005).

* Công nghệ Smarticles™

Công nghệ Smarticles™ dựa trên các hạt sinh học (bioparticle) Smarticles, DNA thiết kế riêng được đóng gói thành các hạt sinh học chứa DNA hoặc plasmid mà các hạt này có thể liên kết với các thụ thể cụ thể trên bề mặt của vi khuẩn mục tiêu. Những hạt này chứa gen mã hoá cho sự tạo thành enzyme luciferase và gen này được kích hoạt khi tiếp xúc với vi khuẩn kháng thuốc. Luciferase là enzyme phát quang sinh học. Sự gia tăng hoạt động của luciferase liên quan trực tiếp đến sự gia tăng số lượng vi khuẩn trong mẫu. Ưu điểm chính của phương pháp này là có thể sử dụng để xác định mầm cảm trực tiếp từ các mẫu máu dương tính mà không cần phải phân lập vi khuẩn. Phương pháp Smarticles sẽ thu được kết quả trong vòng 4 giờ, do đó cung cấp liệu trình kháng sinh tốt nhất để điều trị cho bệnh nhân (Li và ctv, 2017).

* BacterioScan™ FLLS

Phương pháp này sử dụng công nghệ tán xạ ánh sáng laser (FLLS - forward laser light scatter technology) để đo nồng độ của các hạt trong mẫu chất lỏng (đo mật độ quang, OD) cũng như cường độ phân tán theo hướng gần chùm tia laser. Do sử dụng FLLS, có thể được đo OD chính xác gấp 2 lần các phương pháp truyền thống ở nồng độ khoảng 10.000 CFU/ml so với các phương pháp hiện tại (Hayden và ctv, 2016). Hệ thống có thể chạy đồng thời 16 mẫu, với các phép đo được thực hiện tự động 3 phút một lần để có các kết quả đo mật độ quang chính xác. Kỹ thuật này ban đầu được phát triển để phân tích vi khuẩn từ mẫu nước tiểu và hiện tại đã được điều chỉnh để

sử dụng cho thử nghiệm xác định mầm cảm kháng sinh (Model BACTERIOSCAN 216R).

* Accelerate Pheno™

Nguyên tắc hoạt động của hệ thống bao gồm bước chuẩn bị mẫu tự động, mẫu được đưa qua bộ lọc điện gel, bộ lọc này tách các tế bào máu, môi trường nuôi cấy và các mảnh vụn khác trong khi vẫn giữ lại các tế bào vi khuẩn và nấm men (Chantell và ctv, 2015). Các tế bào vi sinh vật đã tinh sạch sẽ được thả vào môi trường nuôi cấy, được đưa vào các băng đa kênh; ở đó chúng được cố định. Mỗi kênh chứa các kháng sinh ở các nồng độ khác nhau. Tại điểm cố định, kính hiển vi trường tối được sử dụng để ghi lại hình ảnh các tế bào mỗi 10 phút một lần để ghi nhận sự phát triển của tế bào. Những hình ảnh này sau đó được phân tích bằng phần mềm và cho kết quả ID/AST trong vòng khoảng 7 giờ (Marschal và ctv, 2017).

* LifeScale®

Hệ thống LifeScale® được phát triển bởi Affinity Biosensors (Mỹ) dựa trên nguyên tắc sử dụng các bộ chuyển động vi sinh để tạo huyền phù tế bào khi vi sinh vật được truyền qua. Khi các tế bào đi qua bộ cộng hưởng, tần số dao động của công xôn thay đổi, tần số này được cảm biến đo và tương quan với sinh khối của vi khuẩn. Bằng cách đo sinh khối riêng lẻ và nồng độ vi khuẩn trên một thể tích mẫu, có thể xác định chính xác đặc điểm nhạy cảm với kháng sinh của những vi khuẩn này (Schneider và ctv, 2001). Trong các mẫu không có kháng sinh, tổng sinh khối sẽ tăng lên theo thời gian, trong khi ở các mẫu có nồng độ kháng sinh bằng hoặc cao hơn nồng độ tới hạn, sẽ có sự mất về tổng sinh khối và khối lượng trung bình của vi khuẩn. Phương pháp này có thể được sử dụng để lấy kết quả trực tiếp từ mẫu máu và mẫu nước tiểu dương tính với nồng độ vi khuẩn >10⁴ CFU/ml. Kết quả thu được phụ thuộc trực tiếp vào thời gian nhân lên của vi khuẩn. Vi khuẩn phát triển nhanh thì thời gian nhân lên khoảng 20-30 phút và mất khoảng 3-4 giờ để đạt được kết quả đánh giá mầm cảm kháng sinh, trong khi nhóm vi khuẩn phát triển chậm hơn sẽ mất nhiều thời gian hơn.

5. Các kỹ thuật tiềm năng

Ngoài các hệ thống thương mại hoá đã trình bày ở trên, một số nghiên cứu cũng công bố các kỹ thuật mới với các nguyên lý hoạt động phức tạp, có thể áp dụng để thực hiện định danh và đánh giá miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn. Tuy nhiên, các kỹ thuật này chưa được phát triển thành các hệ thống thương mại, do đó đây được xem là các kỹ thuật tiềm năng.

5.1. Xét nghiệm FASTest

FASTest dựa trên nguyên tắc bắt các tế bào vi khuẩn trong các kênh nano lỏng riêng lẻ và theo dõi phản ứng của chúng với các loại kháng sinh khác nhau dựa trên hình ảnh trực tiếp. Bằng cách lấy trung bình tốc độ phát triển của vi khuẩn, phương pháp này có thể xác định tính nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh trong vòng 30 phút ở mật độ tế bào thấp (khoảng 10^4 CFU/ml mẫu). Thang đo thời gian và nồng độ làm cho FASTest hữu ích trong việc hướng dẫn điều trị kháng sinh chính đối với một số bệnh nhiễm trùng. Phương pháp này đã được sử dụng để xác định AST của *E. coli* liên quan đến 9 loại kháng sinh khác nhau của Baltekin và ctv (2016).

5.2. Hệ thống quang phổ trở kháng điện vi lỏng (Multi-frequency microchannel electrical impedance, m-EIS)

Phương pháp này sử dụng phép đo trở kháng trên dải tần số rộng để xác định sự thay đổi điện dung của huyền phù chứa vi khuẩn và kháng sinh. Khi có điện trường dòng điện xoay chiều, vi khuẩn hiện diện trong các kênh vi lỏng được thiết kế đặc biệt có thể lưu trữ điện tích qua màng của chúng và do đó hoạt động như tụ điện. Khi số lượng vi khuẩn trong kênh tăng lên, điện dung của hỗn dịch được cho là tăng, trong khi khi vi khuẩn chết (tính trên giá trị MIC của kháng sinh), chúng sẽ mất điện thế màng và kết quả là điện dung của huyền phù chứa vi khuẩn và kháng sinh sẽ giảm. Đây có thể được coi là sự giảm tín hiệu điện của chúng. Do đó, nồng độ của kháng sinh mà tại đó tín hiệu không thay đổi theo thời gian hoặc khi tín hiệu giảm được coi là MIC của chúng.

5.3. Kính hiển vi lực nguyên tử (AFM- Atomic force microscopy cantilever)

Kính hiển vi lực nguyên tử (AFM) hoặc kính hiển vi lực quét (SFM) là một loại kính hiển vi đầu dò quét có độ phân giải rất cao, với độ phân giải được tính bằng nanomet (nm). AFM cung cấp cấu hình 3D của bề mặt bằng kích thước nm, bằng cách đo lực giữa đầu dò nhọn (<10 nm) và bề mặt ở khoảng cách rất ngắn (tách mẫu đầu dò 0,2-10 nm). Đầu dò được hỗ trợ trên một công xôn (cantilever) linh hoạt. Đầu AFM chạm vào bề mặt và ghi lại lực giữa đầu dò và bề mặt. Phương pháp này đo dao động tần số thấp của công xôn. Các vi khuẩn được cố định trên bề mặt của công xôn và sự di chuyển của chúng gây ra sự gia tăng biên độ dao động của công xôn mà buồng cảm biến cảm nhận được. Khi vi khuẩn tiếp xúc với kháng sinh nhạy cảm, hoạt lực của chúng giảm, dẫn đến sự giảm dao động của công xôn (Longo và ctv, 2013). Điều này có thể được sử dụng để xác định nồng độ kháng sinh cụ thể mà vi khuẩn nhạy cảm. Các vi khuẩn kháng thuốc cho thấy sự gia tăng dao động của công xôn hoặc giảm hoạt động ban đầu do thay đổi quá trình trao đổi chất của vi khuẩn, sau đó tế bào trở lại hoạt động bình thường, trong khi các chủng nhạy cảm cho thấy giảm hoạt động của chúng.

6. Kết luận

Đến thời điểm hiện tại, có nhiều phương pháp định danh, xác định mức độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn. Mỗi phương pháp có nguyên tắc thực hiện, những ưu, nhược điểm riêng đã được phân tích. Các phương pháp truyền thống như khuếch tán trên thạch, MIC hay E-test, mất nhiều thời gian, thực hiện thủ công để có kết quả đánh giá ID/AST nhưng có thể nhìn thấy sự phát triển của vi khuẩn, đảm bảo sự đồng nhất của vi khuẩn và có thể lưu giữ gốc vi khuẩn để thực hiện các nghiên cứu khác. Các kỹ thuật này phù hợp để thực hiện ở các phòng thí nghiệm nghiên cứu. Trong khi đó, các hệ thống đánh giá ID/AST tự động có thể rút ngắn các bước thực hiện, chỉ cần bước phân lập vi khuẩn thuần cho Vitek® hay BD Phoenix™, thậm chí đánh giá trực tiếp ID/AST từ mẫu như Accelerate

PhenoTM, QuickMICTM, m-EIS... Các phương pháp hiện đại cung cấp nhanh chóng kết quả xét nghiệm, tiết kiệm thời gian thực hiện, tuy nhiên cần nhiều kinh phí đầu tư trang thiết bị; do đó phù hợp trang bị cho các phòng xét nghiệm điều trị hoặc bệnh viện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anoopkumar-Dukie, S; Carey, JB; Conere, T; O'Sullivan, E; Van Pelt, FN; Allshire, A., 2005. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *British Journal of Radiology*. 78 (934): 945–7.
- Aarestrup, Frank M, Anne Mette Seyfarth, and Øystein Angen, 2004. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Veterinary Microbiology* 101(2): 143–46.
- Baltekin, Özden *et al.*, 2016. Fast antibiotic susceptibility testing based on single cell growth rate measurements. *Molecular Biology*. preprint. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/071407> (September 25, 2020).
- Brogden, Sandra *et al.*, 2018. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* isolates from Germany by use of a proposed standard method for harmonized testing. *Veterinary Microbiology* 217: 32–35.
- CLSI - M07-A10, 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. Wayne, PA 19087 USA. : 110.
- CLSI. 2018. VET08. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard—Fourth Edition. Wayne, PA 19087 USA.
- Đặng Thị Xuân Thiệp, Bùi Nguyễn Hoàng Trang, Lê Thanh Tùng, Lâm Ánh Tuyết, Võ Thị Trà An, 2020. Mức độ nhạy cảm kháng sinh của các gốc *Haemophilus parasuis* phân lập từ heo. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*. Tập XXVII, số 3-2020. Trang 48-55.
- Hayden, Randall T. *et al.*, 2016. Rapid antimicrobial susceptibility testing using forward laser light scatter technology ed. R. Patel. *Journal of Clinical Microbiology* 54(11): 2701–6.
- Khan, Zeeshan A., Mohd F. Siddiqui, and Seungkyung Park, 2019. Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics* 9(2): 49.
- Li, Yiyan, Xing Yang, and Weian Zhao, 2017. Emerging microtechnologies and automated systems for rapid bacterial identification and antibiotic susceptibility testing. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation* 22(6): 585–608.
- Nedbalcová, Kateřina, and Zdeňka Kučerová, 2013. Antimicrobial susceptibility of pasteurilla multocida and haemophilus parasuis isolates associated with porcine pneumonia. *Acta Veterinaria Brno* 82(1): 3–7.
- Schumacher, A. *et al.*, 2018. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 37(2): 187–208.
- Longo G, Alonso-Sarduy L, Rio LM, Bizzini A, Trampuz A, *et al.*, 2013. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors. *Nature nanotechnology* 8: 522.
- Schneider CB, Ken Harris, Peter Khera, Kaveri Strenn, 2001. Steve Rapid Antimicrobial Susceptibility Tests by Mass Measurement on a 96-Well Plate. *Nature nanotechnology* 18: 222.
- Tankeshwar A., 2013. Broth dilution method for MIC Determination. *Antibiotic Resistance, Bacteriology*. <https://microbeonline.com/minimum-inhibitory-concentration-mic-broth-dilution-method-procedure-interpretation/>.