

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM MẪU MÁU GIẢ ĐỊNH ĐÔNG KHÔ VỚI TÁC NHÂN GÂY BỆNH NHIỄM KHUẨN HUYẾT

Nguyễn Thị Hồng Nhiên¹, Vũ Quang Huy²,
Nguyễn Vũ Trung³ và Võ Thị Thùy Nga^{1,✉}

¹Bệnh viện Hoàn Mỹ Sài Gòn

²Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

³Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh

Nghiên cứu sản xuất thử nghiệm mẫu máu giả định chứa tác nhân gây bệnh *Streptococcus pneumoniae* (SP) và *Haemophilus influenzae* (HI) bằng phương pháp đông khô, sử dụng sucrose 5% và huyết thanh 20% giúp bảo vệ vi khuẩn. Nghiên cứu sử dụng phân tích phương sai một yếu tố (Oneway ANOVA) đánh giá tính đồng nhất và phép kiểm T-test đánh giá độ ổn định ở 2 khoảng nhiệt độ là 22 - 30°C (1, 3, 5, 7, 9, 12 tuần) và 2 - 8°C (1, 2, 3, 4, 5, 6 tháng). Kết quả đánh giá tính đồng nhất, Log mật độ trung bình *S. pneumoniae*, *H. influenzae* lần lượt là $5,610 \pm 0,031$ CFU/mL và $5,533 \pm 0,022$ ($F_{\text{thực nghiệm}} < F_{\text{lý thuyết}}$ và $p > 0,05$). Kết quả đánh giá độ ổn định, ở 22 - 30°C, mẫu SP ổn định đến tuần thứ 7 ($p = 0,091$) và mẫu HI ổn định đến tuần thứ 3 ($p = 0,073$); và ở 2 - 8°C, mẫu SP ổn định đến tháng thứ 5 ($p = 0,051$) và mẫu HI ổn định đến tháng thứ 3 ($p = 0,051$). Qua nghiên cứu, sản xuất được hai bộ mẫu máu giả định đông khô chứa *S. pneumoniae*, *H. Influenzae* đạt chất lượng theo ISO 13528; ISO Guide 35.

Từ khóa: Ngoại kiểm tra chất lượng, mẫu máu giả định.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm khuẩn huyết (NKH) là tình trạng rối loạn chức năng cơ quan đe dọa tính mạng do phản ứng của cơ thể đối với tình trạng nhiễm trùng. Nếu không được phát hiện sớm và xử lý kịp thời có thể dẫn đến sốc nhiễm trùng, suy đa tạng và tử vong.¹ Do vậy, việc phát hiện bệnh sớm có ý nghĩa lớn trong công tác điều trị và xét nghiệm cấy máu được xem là tiêu chuẩn vàng giúp chẩn đoán chính xác tình trạng nhiễm khuẩn huyết. Trong lĩnh vực xét nghiệm, đảm bảo chất lượng xét nghiệm giữ vai trò quan trọng và ngoại kiểm tra chất lượng là một trong những công cụ để đánh giá độ tin cậy của xét nghiệm, giúp phòng xét nghiệm phát hiện và

khắc phục những vấn đề không phù hợp xảy ra trong quá trình thực hiện xét nghiệm, từ đó góp phần nâng cao chất lượng xét nghiệm y học.^{2,3} Để triển khai hoạt động ngoại kiểm vi sinh lâm sàng có hiệu quả, cần mẫu kiểm chuẩn đáp ứng tiêu chí bảo quản vi khuẩn gây bệnh (hoặc thường trú) theo quy định của một mẫu dùng cho ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm.⁴ Theo hướng dẫn của WHO (2016), mẫu ngoại kiểm giả định cần mang tính thử thách hơn như chứa tác nhân ít gặp, những tác nhân khó mọc đòi hỏi môi trường dinh dưỡng cao, những thử thách về độ nhạy cảm kháng sinh..., từ đó, giúp đánh giá được năng lực phòng xét nghiệm một cách sâu hơn, rộng hơn.⁵ Hiện nay, ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu về mẫu giả định dùng cho ngoại kiểm vi sinh lâm sàng, nhưng chưa có một nghiên cứu nào về những tác nhân khó mọc như *S. pneumoniae*, *H. influenzae* trong mẫu máu giả định.^{6,7} Áp dụng đông khô vào

Tác giả liên hệ: Võ Thị Thùy Nga

Bệnh viện Hoàn Mỹ Sài Gòn

Email: nga.vo@hoanmy.com

Ngày nhận: 02/08/2023

Ngày được chấp nhận: 21/08/2023

sản xuất mẫu ngoại kiểm, giúp dễ dàng vận chuyển, bảo quản và lưu giữ trong thời gian dài, đảm bảo an toàn sinh học, phù hợp với yêu cầu mẫu dùng trong ngoại kiểm tra chất lượng.⁸ Từ tình hình thực tế trên và kết quả bước đầu của những nghiên cứu về mẫu giả định, chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu sản xuất thử nghiệm mẫu máu giả định đồng khô với tác nhân gây bệnh nhiễm khuẩn máu”.^{6,7,9,10} Với mục tiêu “Nghiên cứu sản xuất thử nghiệm mẫu máu giả định đồng khô chứa tác nhân gây bệnh là *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, đạt tính đồng nhất và độ ổn định theo hướng dẫn của ISO 13528 và ISO Guide 35”.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Nhóm đối tượng

Mẫu máu giả định được sản xuất bằng phương pháp đông khô chứa tác nhân gây bệnh là *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, sử dụng sucrose 5% và huyết thanh 20% giúp bảo quản vi khuẩn trong quá trình đông khô.

Tiêu chuẩn lựa chọn

Vi khuẩn đích: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 và *Haemophilus influenzae* ATCC 49247. Chủng ATCC ở dạng đông khô, được bảo quản ở 2 - 8°C, còn hạn sử dụng trên 30 ngày.

Tiêu chuẩn loại trừ

Chủng ATCC không đạt tiêu chuẩn sau khi cấy kiểm tra tính chất sinh vật hóa học.

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu:

Nghiên cứu thực nghiệm.

Tạo 2 bộ mẫu máu giả định bằng phương pháp đông khô, một bộ mẫu chứa chủng *S. pneumoniae* và một bộ mẫu chứa chủng *H. influenzae*, có nồng độ trong khoảng 10^5 - 10^6 CFU/mL.

Cỡ mẫu:

Quy định về kiểm tra tính đồng nhất và ổn định của mẫu theo ISO 13528:2015 và theo TCVN 8245:2009 (tương đương ISO GUIDE 35:2006); số lượng mẫu dùng trong quá trình đánh giá: tính đồng nhất 10 (mẫu) x 2 (lô) = 20 mẫu, độ ổn định 3 (mẫu) x 6 (thời điểm đánh giá) x 2 (nhiệt độ) x 2 (lô) = 72 mẫu. Cỡ mẫu được tính cho cả quá trình nghiên cứu: $n = 20 + 72 = 92$ mẫu.^{11,12}

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Trung tâm Kiểm chuẩn Chất lượng Xét nghiệm Y học, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh (đạt ISO 9001: 2015 do tổ chức AJA-Anh Quốc cấp và ISO/EIC 17043:2010). Thời gian nghiên cứu từ tháng 10/2020 đến tháng 06/2021.

Nội dung nghiên cứu:

Chuẩn bị nguyên liệu và sản xuất bộ mẫu máu giả định đồng khô, theo các bước:

Bước 1: Thu thập, kiểm tra nguyên liệu đầu vào (vi khuẩn, cơ chất, sucrose...).

Bước 2: Pha môi trường máu giả định với yếu tố bảo vệ sucrose 5% và huyết thanh 20% (đảm bảo độ vô trùng).

Bước 3: Đánh giá độ vô trùng, cảm quan của môi trường máu giả định, pha huyền dịch vi khuẩn 0,5 McFarland.

Bước 4: Phối trộn huyền dịch vi khuẩn vào môi trường máu giả định theo tỷ lệ 1/100.

Bước 5: Phân phối mẫu máu vào lọ đông khô, sau đó đông lạnh mẫu ở -80°C/ 24 giờ.

Bước 6: Đông khô mẫu ở 0,04 mbar/18 - 24 giờ, trên máy Labconco – Mỹ.¹⁰

Bước 7: Đóng gói mẫu.

Bước 8: Đánh giá tính đồng nhất và độ ổn định của 2 bộ mẫu.

Thực hiện theo tiêu chuẩn ISO 13528:2015 và theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8245:2009

(tương đương ISO Guide 35:2006):

Đánh giá tính đồng nhất:

Đánh giá tính đồng nhất được thực hiện ở giai đoạn sau khi phân phối vào mỗi lọ. Tiến hành lựa chọn ngẫu nhiên 10 mẫu trong mỗi lô. Các mẫu được đánh giá tính đồng nhất dựa trên kết quả cấy định danh, cấy đếm vi khuẩn (CFU/mL), nhuộm Gram. Mỗi mẫu được cấy lặp lại 2 lần, bởi 2 người khác nhau.

Đánh giá độ ổn định:

Mẫu được bảo quản ở 2 nhiệt độ: nhiệt độ 22 - 28°C, đánh giá ở các thời điểm tuần 1, 3, 5, 7, 9, 12 và nhiệt độ 2 - 8°C, đánh giá ở các thời điểm tháng 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Tiến hành lựa chọn ngẫu nhiên 3 mẫu tại một thời điểm ở mỗi nhiệt độ khi đánh giá.

Các mẫu được đánh giá tính ổn định dựa trên kết quả cấy định danh, cấy đếm vi khuẩn (CFU/mL), nhuộm Gram. Mỗi mẫu được cấy lặp lại 2 lần, bởi 2 người khác nhau.

Kết quả sẽ được so sánh với kết quả đánh giá độ đồng nhất ban đầu.

Kỹ thuật xét nghiệm:

Định danh vi khuẩn: sử dụng bộ kit thương phẩm có sẵn trên thị trường là bộ Kit API (biomerieux) để định danh vi khuẩn (theo hướng dẫn của Nhà sản xuất).

Xác định nồng độ vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm giả định: sử dụng đĩa thạch BA (với *S. pneumoniae*) và CAXV (với *H. influenzae*) để đánh giá nồng độ vi khuẩn. Phương pháp tính: Tính số lượng (N) vi sinh vật có trong mẫu thử theo trung bình khối lượng từ hai độ pha loãng liên tiếp, theo công thức:

$$A \text{ (CFU/}\mu\text{L)} = \frac{N}{n1Vf1 + n2Vf2}$$

Trong đó:

A: số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1 μL mẫu.

N: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn.

ni: số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i.

V: thể tích dịch mẫu (μL) cấy vào trong mỗi đĩa.

fi: độ pha loãng tương ứng.

Xử lý số liệu

Sử dụng phân tích phương sai một yếu tố (oneway ANOVA) đánh giá tính đồng nhất của bộ mẫu. Với $F_{\text{thực nghiệm}} < F_{\text{lý thuyết}}$ và $p > 0,05$, kết luận mẫu đồng nhất.

Sử dụng kiểm định T-test độc lập đánh giá độ ổn định của bộ mẫu ở 2 khoảng nhiệt độ, ở 22 - 30°C đánh giá tại thời điểm 1, 3, 5, 7, 9, 12 tuần và ở 2 - 8°C đánh giá tại thời điểm 1, 2, 3, 4, 5, 6 tháng. Với $p > 0,05$, kết luận mẫu ổn định.

Dữ liệu được nhập và xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và Stata 13.0.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được sự chấp thuận bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học – Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh (quyết định số 750/ĐHYDHĐĐĐ ngày 22 tháng 10 năm 2020).

III. KẾT QUẢ

Qua thời gian thu thập nguyên liệu, sản xuất thử nghiệm và đánh giá mẫu máu giả định đông khô. Kết quả đạt được như sau:

1. Đánh giá tính đồng nhất hai bộ mẫu máu giả định

Bảng 1. Kết quả đánh giá tính đồng nhất của bộ mẫu *S. pneumoniae*

Mẫu <i>S. pneumoniae</i> (Mẫu SP)	Lần 1	Lần 2	Trung bình	SD
1	5,58	5,61	5,595	0,021
2	5,69	5,65	5,670	0,028
3	5,57	5,60	5,585	0,021
4	5,62	5,59	5,605	0,021
5	5,61	5,65	5,630	0,228
6	5,60	5,63	5,615	0,021
7	5,63	5,58	5,605	0,035
8	5,61	5,58	5,595	0,021
9	5,59	5,63	5,610	0,028
10	5,60	5,57	5,585	0,021
Trung bình (\bar{X})			5,610	0,031
Độ tự do		df1 = 9; df2 = 10		
F _{lý thuyết}		3,02		
F _{thực nghiệm}		2,02		
p		0,144		

Từ bảng 1 cho thấy, mật độ Log_{10} (CFU/mL) trung bình chung *S. pneumoniae* đạt 5,610 với độ lệch chuẩn 0,031. Giá trị $F_{\text{thực nghiệm}} = 2,02 < F_{\text{lý thuyết}} = 3,02$ (tra bảng phân phối F với bậc tự

do df1 = 9; df2 = 10); sự khác biệt giữa các mẫu không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,144 > 0,05$. Như vậy, mật độ vi khuẩn *S. pneumoniae* ở các mẫu (lô mẫu SP) đồng nhất.

Bảng 2. Kết quả đánh giá tính đồng nhất của bộ mẫu *H. influenzae*

Mẫu <i>H. influenzae</i> (Mẫu HI)	Lần 1	Lần 2	Trung bình	SD
1	5,51	5,50	5,505	0,007
2	5,52	5,52	5,520	0,000
3	5,57	5,51	5,540	0,042
4	5,51	5,56	5,535	0,035
5	5,50	5,54	5,520	0,028

Mẫu <i>H. influenzae</i> (Mẫu HI)	Lần 1	Lần 2	Trung bình	SD
6	5,55	5,53	5,540	0,014
7	5,52	5,55	5,535	0,021
8	5,53	5,54	5,535	0,007
9	5,55	5,56	5,555	0,007
10	5,56	5,53	5,545	0,021
Trung bình (\bar{X})			5,533	0,022
Độ tự do	df1 = 9; df2 = 10			
$F_{\text{lý thuyết}}$	3,02			
$F_{\text{thực nghiệm}}$	0,81			
p	0,619			

Từ bảng 2 cho thấy, mật độ Log_{10} (CFU/mL) trung bình chung *H. influenzae* đạt 5,533 với độ lệch chuẩn 0,022. Giá trị $F_{\text{thực nghiệm}} = 0,81 < F_{\text{lý thuyết}} = 3,02$ (tra bảng phân phối F với bậc tự do df1 = 9; df2 = 10); sự khác biệt giữa các mẫu

không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,619 > 0,05$. Như vậy, mật độ vi khuẩn *H. influenzae* ở các mẫu (lô mẫu HI) đồng nhất.

2. Đánh giá độ ổn định bộ mẫu máu chứa *S. pneumoniae*

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ ổn định Log_{10} (CFU/mL) bộ mẫu máu chứa *S. pneumoniae* ở nhiệt độ 22 - 30 °C

Ở nhiệt độ 22 - 30 °C		Lô mẫu chứa <i>S. pneumoniae</i> qua các thời điểm						
		T0	Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	Tuần 7	Tuần 9	Tuần 12
Mẫu 1	Lần 1	5,610	5,666	5,661	5,644	5,588	5,360	5,190
	Lần 2	5,850	5,646	5,641	5,614	5,568	5,340	5,100
Mẫu 2	Lần 1	5,680	5,686	5,661	5,674	5,628	5,320	4,950
	Lần 2	5,560	5,636	5,651	5,634	5,558	5,320	5,120
Mẫu 3	Lần 1	5,670	5,676	5,641	5,594	5,608	5,330	4,870
	Lần 2	5,720	5,656	5,671	5,634	5,618	5,310	5,050
Trung bình (\bar{X})		5,682	5,661	5,654	5,632	5,595	5,33	5,047
Độ lệch chuẩn		0,100	0,019	0,012	0,027	0,028	0,018	0,118
p		1,000	0,641	0,542	0,621	0,091	0,001	0,001

Từ bảng 3 ta thấy, ở 22 - 30 °C, nhiệt độ phòng xét nghiệm. Kết quả đánh giá độ ổn

định cho thấy, mật độ *S. pneumoniae* có xu hướng giảm theo thời gian với Log_{10} từ 5,682

tại thời điểm ban đầu còn 5,047 sau 12 tuần ($p = 0,001$). Mật độ vi khuẩn ổn định đến tuần thứ

7 với $\text{Log}_{10} = 5,595$ và $p = 0,091$. Độ ổn định của mẫu đảm bảo trong suốt thời gian 7 tuần.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ ổn định Log_{10} (CFU/mL) bộ mẫu máu chứa *S. pneumoniae* ở nhiệt độ 2 - 8°C

Ở nhiệt độ 2 - 8°C		Lô mẫu chứa <i>S. pneumoniae</i> qua các thời điểm						
		T0	Tháng 1	Tháng 2	Tháng 3	Tháng 4	Tháng 5	Tháng 6
Mẫu 1	Lần 1	5,610	5,603	5,641	5,570	5,621	5,590	5,525
	Lần 2	5,850	5,623	5,631	5,590	5,641	5,610	5,545
Mẫu 2	Lần 1	5,680	5,653	5,611	5,650	5,581	5,560	5,605
	Lần 2	5,560	5,683	5,591	5,620	5,601	5,600	5,575
Mẫu 3	Lần 1	5,670	5,663	5,591	5,570	5,591	5,540	5,525
	Lần 2	5,720	5,623	5,621	5,610	5,561	5,570	5,565
Trung bình (\bar{X})		5,682	5,641	5,614	5,602	5,599	5,578	5,557
Độ lệch chuẩn		0,100	0,030	0,021	0,031	0,029	0,026	0,029
p		1,000	0,429	0,136	0,128	0,089	0,051	0,036

Từ bảng 4 ta thấy, ở 2 - 8°C, nhiệt độ bảo quản mẫu. Kết quả đánh giá độ ổn định cho thấy, mật độ *S. pneumoniae* có xu hướng giảm theo thời gian với Log_{10} từ 5,682 tại thời điểm ban đầu còn 5,557 sau 6 tháng ($p = 0,036$). Mật

độ vi khuẩn ổn định đến tháng thứ 5 với $\text{Log}_{10} = 5,578$ và $p = 0,051$. Độ ổn định của mẫu đảm bảo trong suốt thời gian 5 tháng.

3. Đánh giá độ ổn định bộ mẫu máu chứa *H. influenzae*

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ ổn định Log_{10} (CFU/mL) bộ mẫu máu chứa *H. influenzae* ở nhiệt độ 22 - 30°C

Ở nhiệt độ 22 - 30°C		Lô mẫu chứa <i>H. influenzae</i> qua các thời điểm						
		T0	Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	Tuần 7	Tuần 9	Tuần 12
Mẫu 1	Lần 1	5,530	5,518	5,549	5,229	5,099	4,759	4,399
	Lần 2	5,540	5,478	5,489	5,109	5,059	4,719	4,339
Mẫu 2	Lần 1	5,620	5,508	5,439	5,199	5,009	4,639	4,329
	Lần 2	5,580	5,488	5,509	5,159	5,069	4,699	4,359
Mẫu 3	Lần 1	5,480	5,498	5,459	5,089	5,079	4,679	4,369
	Lần 2	5,510	5,528	5,439	5,149	5,029	4,659	4,399
Trung bình (\bar{X})		5,543	5,503	5,481	5,156	5,057	4,692	4,366
Độ lệch chuẩn		0,050	0,019	0,044	0,053	0,033	0,043	0,029
p		1,000	0,140	0,073	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Từ bảng 5 ta thấy, ở 22 - 30°C, nhiệt độ phòng xét nghiệm. Kết quả đánh giá độ ổn định cho thấy, mật độ *H. influenzae* có xu hướng giảm theo thời gian với Log_{10} từ 5,543 tại thời

điểm ban đầu còn 4,366 sau 12 tuần ($p < 0,001$). Mật độ vi khuẩn ổn định đến tuần thứ 3 với $\text{Log}_{10} = 5,481$ và $p = 0,073$. Độ ổn định của mẫu đảm bảo trong suốt thời gian 3 tuần.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ ổn định Log_{10} (CFU/mL) bộ mẫu máu chứa *H. influenzae* ở nhiệt độ 2 - 8°C

Ở nhiệt độ 2 - 8°C		Lô mẫu chứa <i>H. influenzae</i> qua các thời điểm						
		T0	Tháng 1	Tháng 2	Tháng 3	Tháng 4	Tháng 5	Tháng 6
Mẫu 1	Lần 1	5,530	5,490	5,480	5,420	5,030	4,930	4,320
	Lần 2	5,540	5,450	5,500	5,480	5,050	4,980	4,380
Mẫu 2	Lần 1	5,620	5,530	5,490	5,500	5,220	4,950	4,410
	Lần 2	5,580	5,550	5,460	5,460	5,180	4,910	4,360
Mẫu 3	Lần 1	5,480	5,510	5,480	5,520	5,190	4,920	4,390
	Lần 2	5,510	5,530	5,510	5,480	5,050	4,860	4,370
Trung bình (\bar{X})		5,543	5,510	5,487	5,477	5,120	4,925	4,372
Độ lệch chuẩn		0,050	0,036	0,017	0,034	0,085	0,040	0,031
p		1,000	0,175	0,058	0,051	<0,001	<0,001	<0,001

Từ bảng 6 ta thấy, ở 2 - 8°C, nhiệt độ bảo quản mẫu. Kết quả đánh giá độ ổn định cho thấy, mật độ *H. influenzae* có xu hướng giảm theo thời gian với Log_{10} từ 5,543 tại thời điểm ban đầu còn 4,372 sau 6 tháng ($p < 0,001$). Mật độ vi khuẩn ổn định đến tháng thứ 3 với $\text{Log}_{10} = 5,477$ và $p = 0,051$. Độ ổn định của mẫu đảm bảo trong suốt thời gian 3 tháng.

IV. BÀN LUẬN

Bộ mẫu máu giả định áp dụng công nghệ đông khô giúp bảo vệ vi khuẩn tốt hơn, kéo dài thời gian lưu trữ, bảo quản vi khuẩn trong mẫu, đảm bảo an toàn sinh học... Nhóm nghiên cứu sản xuất mẫu theo quy trình theo ISO Guide 35:2006, gồm 8 bước: thu thập, kiểm tra nguyên liệu đầu vào; pha môi trường máu giả định, pha huyền dịch vi khuẩn; đánh giá độ vô trùng, cảm quan mẫu máu giả định; phối trộn;

phân phối mẫu; đông khô; đóng gói; đánh giá tính đồng nhất, độ ổn định của bộ mẫu.¹² Sau đông khô, cả 2 bộ mẫu sau khi sản xuất được đánh giá tính đồng nhất và độ ổn định theo ISO 13528:2015.¹¹ Sử dụng phân tích phương sai một yếu tố (oneway ANOVA) để đánh giá tính đồng nhất của cả 2 bộ mẫu, ở bảng 1, đối với *S. pneumoniae*, giá trị $F_{\text{thực nghiệm}} = 2,02 < F_{\text{lý thuyết}} = 3,02$ và $p = 0,144 > 0,05$, cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, mẫu đạt tính đồng nhất. Ở bảng 2, đối với *H. influenzae*, mẫu đảm bảo tính đồng nhất khi giá trị $F_{\text{thực nghiệm}} = 0,81 < F_{\text{lý thuyết}} = 3,02$ và $p = 0,619 > 0,05$ sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Độ ổn định của 2 bộ mẫu được đánh giá ở 2 nhiệt độ là 22 - 30°C (1, 3, 5, 7, 9, 12 tuần) và 2 - 8°C (1, 2, 3, 4, 5, 6 tháng) qua kiểm định T-test độc lập, nếu $p > 0,05$ mẫu đạt độ ổn định. Ở nhiệt độ 22 - 30°C, *S. pneumoniae* (bảng 3) đạt độ

ổn định đến tuần thứ 7 (với $p = 0,091 > 0,05$), trong khi *H. influenzae* (bảng 5) độ ổn định đạt đến tuần thứ 3. Khi cả 2 bộ mẫu đều có cùng cơ chất, cùng yếu tố bảo vệ đông khô, cùng điều kiện bảo quản nhưng lại có sự khác biệt về độ ổn định có thể là do sự khác biệt về đặc tính chủng vi khuẩn; do mỗi loại vi khuẩn thích ứng với từng loại chất bảo vệ khác nhau đều này đã được chứng minh trong nghiên cứu của Jindrich Peiren và cộng sự khi đánh giá tỷ lệ sống của 5 chủng vi khuẩn được cho là khó mọc trên từng nhóm chất bảo vệ khác nhau.¹³ Điều này cũng phù hợp trong nguyên tắc đông khô của Gerald Adams, sản phẩm đông khô nhạy cảm với sự phân hủy nhiệt độ và nhận định của M. B. Kupletskaya, tế bào sau khi đông khô sẽ bị chết nhanh khi bảo quản ở nhiệt độ phòng, đặc biệt là ở nhiệt độ 30°C.^{14,15} Trong nghiên cứu Vũ Quang Huy và cộng sự (2019), chủng *E. coli* đạt ổn định đến ngày 19 và chủng *S. aureus* đạt ổn định đến ngày 17, nghiên cứu của chúng tôi đạt độ ổn định cao hơn khi ở cùng nhiệt độ.⁶ Tuy nhiên, *S. pneumoniae* chỉ ổn định đến tuần thứ 7 và *H. influenzae* chỉ ổn định đến tuần thứ 3, ở nhiệt độ phòng. Những tuần quan sát tiếp sau đó đến tuần thứ 12, cả 2 chủng đều có mật độ vi khuẩn dao động trong khoảng 4 đến 5 log₁₀ (CFU/mL) nên vẫn có thể áp dụng mẫu vào ngoại kiểm vi sinh với mục đích định danh vi khuẩn mà không làm ảnh hưởng đến việc đánh giá kỹ thuật chuyên môn của PXN tham gia. Ở nhiệt độ 2 - 8°C, *S. pneumoniae* (bảng 4) đạt độ ổn định đến tháng thứ 5, còn *H. influenzae* đạt độ ổn định đến tháng thứ 3 (bảng 6). Ở nhiệt độ 22 - 30°C, các loài khác nhau có độ ổn định khác nhau khi ở cùng điều kiện, nhưng độ ổn định tốt hơn khi kéo dài trên 3 tháng. Trần Diệp Tuấn và cộng sự (2021) khi nghiên cứu chủng *E. coli* và *E. faecalis* trong mẫu cấy nước tiểu đông khô cho thấy độ ổn định trong 3 tháng.¹⁰ Nghiên cứu của chúng tôi đạt độ ổn định cao hơn hoặc bằng khi ở cùng

nhiệt độ. Sau 6 tháng bảo quản, tuy cả 2 bộ mẫu đều không đạt độ ổn định (với $p < 0,05$) nhưng mật độ vi khuẩn vẫn dao động trong khoảng 4 đến 5 log₁₀ (CFU/mL). Trong nghiên cứu của Jindrich Peiren và cộng sự (2015), 5 chủng được đánh giá trên từng chất bảo vệ khác nhau, sau 6 tháng mật độ vi khuẩn các chủng đều giảm từ 1 đến 3 bậc của log₁₀; mật độ vi khuẩn của các chủng trong nghiên cứu của M. B. Kupletskaya và cộng sự cũng giảm từ 2 đến 3 bậc của log₁₀, sau 50 năm bảo quản.¹⁵ Sự khác nhau trên có thể xuất phát từ nhiều nguyên nhân, như nồng độ vi khuẩn ban đầu, tốc độ đông lạnh, môi trường tăng trưởng, chất bảo vệ, môi trường hoàn nguyên và thời gian.¹³

Sản xuất thử nghiệm 2 bộ mẫu máu giả định đông khô phục vụ chương trình ngoại kiểm vi sinh với chủng vi khuẩn đích khác nhau (*S. pneumoniae* đại diện vi khuẩn Gram dương và *H. influenzae* đại diện vi khuẩn Gram âm). Nghiên cứu này, giúp tăng cường hiệu quả trong công tác đánh giá chất lượng của các PXN tham gia và đánh giá được kỹ năng chuyên môn của kỹ thuật viên; đồng thời đánh giá quy trình chuẩn (SOP) mà PXN đang thực hiện có đảm bảo được tính chính xác để phát hiện, định danh đúng tác nhân gây bệnh trong mẫu máu bị nhiễm khuẩn. Mẫu bệnh phẩm giả định trong nghiên cứu của chúng tôi có độ ổn định hơn so với mẫu máu giả định dạng lỏng khi nghiên cứu ở cùng nhiệt độ, là do áp dụng công nghệ đông khô trên hệ thống máy đông khô Labconco (Mỹ) tại Trung tâm Kiểm chuẩn Chất lượng Xét nghiệm - Đại học Y Dược Tp Hồ Chí Minh.

Kết quả nghiên cứu với *S. pneumoniae* và *H. influenzae* đạt tiêu chuẩn ISO 35: 2006, ISO 13528:2003 cho thấy, quy trình sử dụng để sản xuất thử nghiệm là hoàn toàn có thể áp dụng để sản xuất mẫu máu giả định đông khô ở quy mô phòng thí nghiệm ứng dụng trong các chương trình ngoại kiểm chất lượng vi sinh lâm sàng.

V. KẾT LUẬN

Bộ mẫu máu giả định đông khô chứa tác nhân gây nhiễm khuẩn huyết là *S. pneumoniae* và *H. influenzae* được đánh giá chất lượng theo ISO 13528 và ISO 35, đạt tính đồng nhất và độ ổn định lần lượt là 7 tuần và 3 tuần ở nhiệt độ 22 - 30°C; 5 tháng và 3 tháng ở nhiệt độ 2 - 8°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Singer M, Deutschman C. S, Seymour C. W, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8): 801-810.
2. Bộ Y tế. Quyết định số 2429/QĐ-BYT. Quyết định Ban hành tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm Y học. 2017: 27-28.
3. Vũ Quang Huy, Trần Thái, Bùi Quang Sang và cộng sự. Nâng cao chất lượng xét nghiệm y học từ 2015 đến 6 tháng đầu 2018 qua các chương trình ngoại kiểm - Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng xét nghiệm Bộ Y tế tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2018; 22(5): 290-297.
4. World Health Organization. WHO/NICD microbiology external quality assessment programme in Africa. 2007.
5. World Health Organization. WHO manual for organizing a national external quality assessment programme for health laboratories and other testing sites. 2016.
6. Vũ Quang Huy, Hà Mạnh Tuấn, Hoàng Tiến Mỹ và cộng sự. Nghiên cứu thử nghiệm mẫu máu giả định ứng dụng trong ngoại kiểm vi sinh. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2019; 23(3): 324-331.
7. Vũ Quang Huy, Lê Ngọc Minh Trân. Xây dựng quy trình thử nghiệm sản xuất mẫu tiêu bản nhuộm Gram, mẫu phân và mù giả định dùng trong Ngoại kiểm vi sinh. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2017; 21(5): 231-238.
8. Fonseca F, Cenard S, Passot S. Freeze-drying of lactic acid bacteria. *Methods in Molecular Biology*. 2015; 477-488.
9. Hà Mạnh Tuấn, Vũ Quang Huy, Trần Nhật Nguyên và cộng sự. Nghiên cứu sản xuất mẫu nước tiểu giả định ứng dụng trong ngoại kiểm tổng phân tích 10 thông số nước tiểu. *Tạp chí Y Dược học quân sự*. 2019; 44(5): 34-40.
10. Tran Diep Tuan, Vu Quang Huy, Huynh Minh Tuan, et al. Production and application of lyophilized urine samples used in microbiology external quality assessment programme in Vietnam. *MedPharmRes*. 2021; 5(2): 29-35.
11. The International Organization for Standardization. ISO 13528:2015. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. 2015.
12. Tiêu chuẩn Quốc gia. TCVN 8245:2009 (ISO GUIDE 35:2006). Mẫu chuẩn-Nguyên tắc chung và nguyên tắc thống kê trong chứng nhận. 2009.
13. Peiren J, Buyse J, De Vos P. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(8): 3559-3571.
14. Adams G. The Principles of Freeze-Drying. *Methods in Molecular Biology*. 2007.
15. Kupletskaya M B, Netrusov A I. Viability of lyophilized microorganisms after 50-year storage. *Microbiology*. 2011; 80(6): 850-853.

Summary

EXPERIMENTING PRODUCTION OF LYOPHILIZED ARTIFICIAL BLOOD SAMPLES CONTAIN THE CAUSATIVE AGENTS OF BLOODSTREAM INFECTIONS

This is an experimental research for production of artificial blood samples containing *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* cells by freeze-drying method with using sucrose 5% and human serum 20% as lyoprotectant to preserve bacteria. The empirical research method was used for this research. The one-way analysis of variance (ANOVA) is used to assess the homogeneity while T-test is used to assess stability at two different temperature ranges- at 22 - 30°C after 1, 3, 5, 7, 9, 12 weeks and at 2 - 8°C after 1, 2, 3, 4, 5, 6 months. Through the assessment of homogeneity, the Log average concentration of *S. pneumoniae*, *H. influenzae* cells in artificial blood samples were 5.610 ± 0.031 CFU/mL and 5.533 ± 0.022 CFU/mL ($F_{\text{experimental}} < F_{\text{theory}}$ và $p > 0.05$). By evaluating stability, at 22 - 30°C, SP samples were stable after 7 weeks ($p = 0.091$) and HI samples were stable after 3 weeks ($p = 0.073$); while at 2 - 8°C, SP samples were stable after 5 months ($p = 0.051$) and HI samples were stable after 3 months ($p = 0.051$). Through this research, we demonstrated that two sets of artificial blood samples containing *S. pneumoniae* and *H. influenzae* met the quality standards of ISO 13528 and ISO Guide 35.

Keywords: EQA (External Quality Assessment), blood assumes.