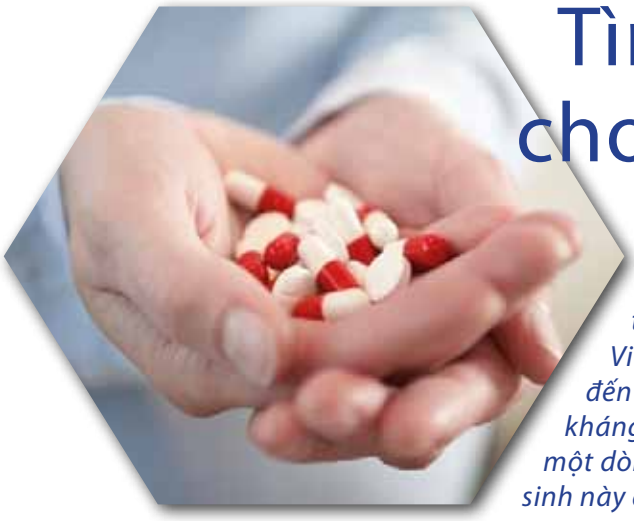


Tìm kiếm kháng sinh cho vi khuẩn lờn thuốc

✧ HOÀNG MI

Hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn ngày càng gia tăng, trong đó có vai trò sử dụng kháng sinh bừa bãi của con người. Việc lạm dụng kháng sinh đẩy nhiều bệnh nhân nhiễm khuẩn đến tình trạng vô phương cứu chữa. Hiện nay, phương pháp kháng sinh đồ là cách để tìm ra loại kháng sinh mẫn cảm đối với một dòng vi khuẩn gây bệnh nào đó và từ đó có thể sử dụng kháng sinh này để trị con vi khuẩn mới hoặc đã trở nên kháng thuốc.

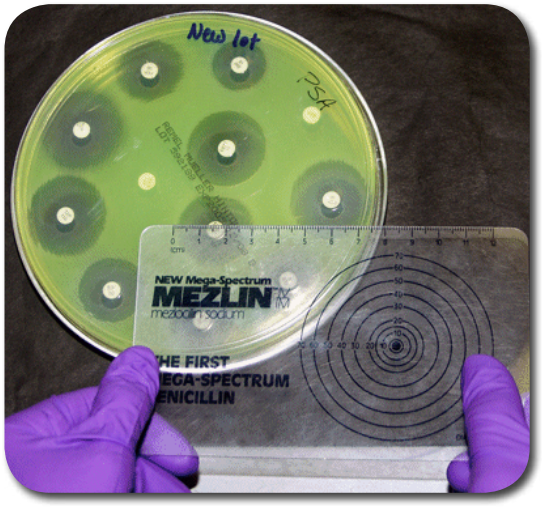
Hiện có một lượng không nhỏ người dân bị bất kỳ bệnh gì cũng dùng kháng sinh và tự mua thuốc không cần có đơn của bác sĩ, có trường hợp lại tự thay đổi loại kháng sinh liên tục. Lạm dụng kháng sinh làm cho vi khuẩn kháng thuốc ngày càng nhiều, từ đó việc chữa trị bệnh thêm khó khăn, tác dụng chữa trị của kháng sinh ngày càng hạn chế. Để khắc phục tình trạng này, kháng sinh đồ sẽ giúp cho bác sĩ xác định chính xác loại kháng sinh nào có thể chống lại con vi khuẩn kháng thuốc đó. Nói cách khác, kháng sinh đồ là xét nghiệm phát hiện sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn thử nghiệm, giúp xây dựng phát đồ điều trị kháng sinh bước đầu theo kinh nghiệm. Ngoài ra, kháng sinh đồ còn giúp theo dõi tình hình và khuynh hướng đề kháng của một loại vi khuẩn nào đó để có chiến lược phòng chống hay tìm kháng sinh mới hay công thức và cách sử dụng mới của một loại kháng sinh cũ.

Để xây dựng một kháng sinh đồ tin cậy cần lưu ý nhiều yếu tố khác nhau như chỉ định kháng sinh để làm kháng sinh đồ, kỹ thuật thực hiện có kết quả không, đọc kết quả có chính xác không…. Có nhiều cách để thực hiện kháng sinh đồ, bốn cách phổ dụng, dễ thực hiện như sau:

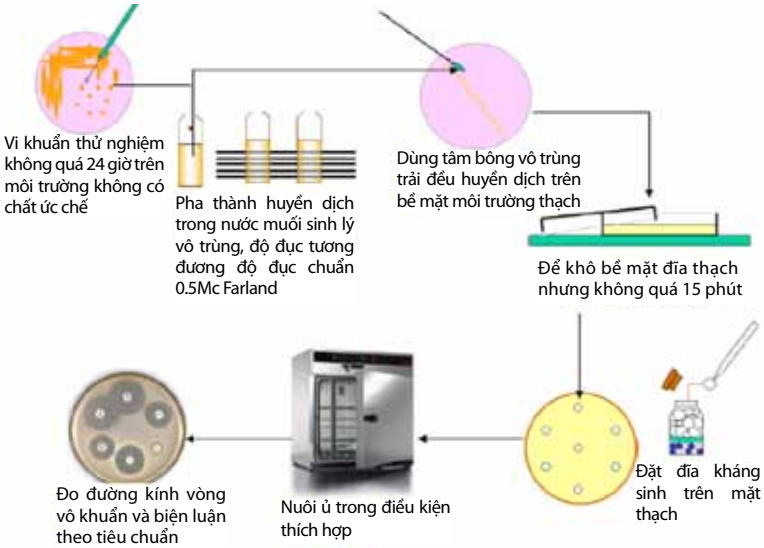
Kháng sinh đồ bằng đĩa kháng sinh

Được phát triển từ thập niên 1940 và hoàn thiện vào thập niên 1950 bởi Kirby và Bauer. Được WHO công nhận là phương pháp chuẩn thức vào năm 1966. Khoanh (đĩa) giấy kháng sinh đồ được nghiên cứu và sản xuất trên một loại giấy đặt biệt. Trên giấy sẽ được tẩm một hay nhiều loại kháng sinh khác nhau với các nồng độ thích hợp. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc kháng sinh ở trong khoanh giấy sẽ khuếch tán vào thạch Meuler-hinton có chứa các chủng vi khuẩn thử nghiệm và mức độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh được biểu hiện bằng đường kính các vòng vô khuẩn xung quanh khoanh giấy kháng sinh. Phương pháp này chủ yếu xác định định tính chứ chưa xác định con số cụ thể về kháng sinh.

Qui trình này được xây dựng dựa trên các thường qui chuẩn thức của Việt Nam và dựa trên qui trình thao tác chuẩn về thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh của CLSI (Clinical Laboratory Standard



Đo đường kính vòng vô khuẩn để biện luận giá trị kháng của thuốc



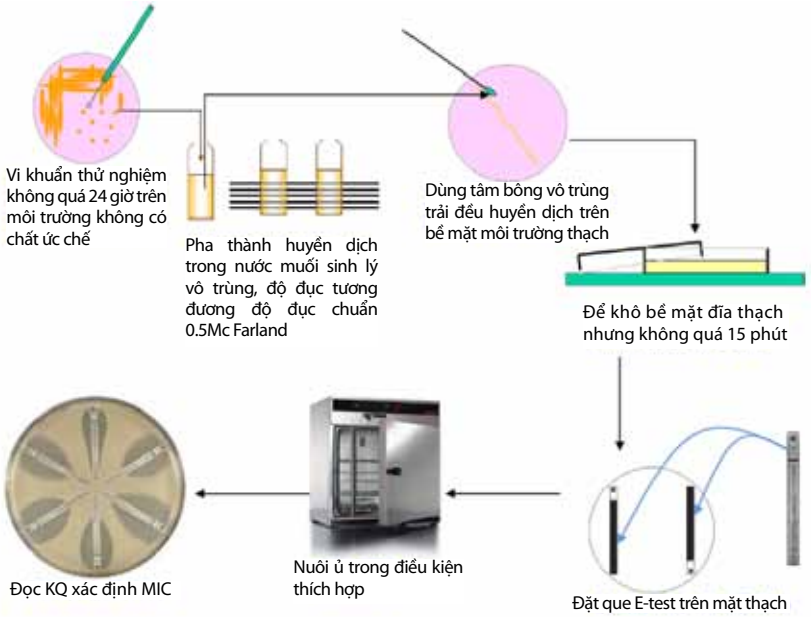
Quy trình thực hiện kháng sinh đồ bằng đĩa kháng sinh

Institute) năm 2010. Nếu thực hiện qui trình một cách chính xác, sẽ thu được các kết quả mà qua đó có thể dự báo được một cách chắc chắn các kháng sinh có tác dụng trên lâm sàng.

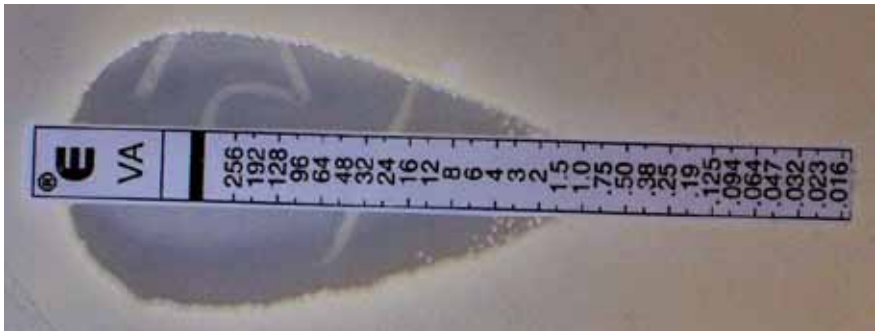
Quy trình thực hiện kháng sinh đồ bằng đĩa kháng sinh khá đơn giản, bao gồm: nuôi cấy vi khuẩn thử nghiệm → lấy vi khuẩn pha thành huyền dịch → dùng tăm bông vô trùng trải đều huyền dịch lên bề mặt thạch → để khô đĩa thạch trong thời gian ngắn → đặt đĩa kháng sinh lên mặt thạch → nuôi ủ trong điều kiện vô trùng → đo đường kính và biện luận kết quả. Tuy nhiên, để thực hiện quy trình một cách chính xác đòi hỏi nhiều yếu tố, ví dụ như môi trường sử dụng có nồng độ chất dinh dưỡng phù hợp, thạch đổ đúng độ dày chuẩn (theo đơn vị milimet), pH đúng chuẩn, nồng độ vi khuẩn đúng chuẩn, khoanh giấy kháng sinh phải được bảo quản kỹ lưỡng và còn trong hạn sử dụng, thao tác kỹ thuật phải chính xác. Các nhóm vi khuẩn khác nhau có một bảng tiêu chuẩn riêng, không dùng chung cho nhau được.

Kháng sinh đồ bằng xác định MIC (tìm nồng độ tối thiểu của kháng sinh ức chế được vi khuẩn)

Có nhiều phương pháp để tìm nồng độ tối thiểu của kháng sinh ức chế được vi khuẩn. Cổ điển nhất là pha loãng kháng sinh trong nước hay thạch, phương pháp vi pha loãng, phương pháp Epsilometer test (E test). MIC có lợi thế là có thể xác định nồng độ tối thiểu của kháng sinh và từ đó bác sĩ có thể tiên đoán rằng điều trị kháng sinh trên bệnh nhân có thành công hay không và liều lượng cần thiết là bao nhiêu.



Quy trình thực hiện kháng sinh đồ bằng E test



Kết quả có thể đọc được dễ dàng nhờ vào các chỉ số được in trên que E test.

E test được mô tả vào năm 1988 và được thương mại hóa vào 1991 bởi hãng AB Biodisk (Thụy Điển). Dựa trên nguyên tắc kháng sinh được tẩm trên que giấy theo gradient nồng độ và khuếch tán trên môi trường, ức chế vi khuẩn tạo thành vùng vô khuẩn có hình elip. E test dễ dàng sử dụng trong lâm sàng và thực hiện giống như phương pháp kháng sinh đồ bằng đĩa kháng sinh. Sau đó, chỉ cần đọc đúng con số trên que. Quy trình bao gồm: nuôi cấy vi khuẩn thử nghiệm → lấy vi khuẩn pha thành huyền dịch → dùng tăm bông vô trùng trải đều huyền dịch lên bề mặt thạch → để khô đĩa thạch trong thời gian ngắn → đặt que E test lên mặt thạch → nuôi ủ trong điều kiện vô trùng → đọc kết quả tương ứng với chỉ số trên que.

E test có độ chính xác cao. Trong thử nghiệm, E test cho kết quả chính xác với 89% loài vi khuẩn Hemophilus influenzae và 80% loài cầu khuẩn. Tuy nhiên, E test khá tốn kém, một que E test cần khoảng 5 USD mà chỉ áp dụng cho một loại vi khuẩn. Nếu nhiều loại vi khuẩn thì sẽ rất tốn kém.

Kháng sinh đồ xác định MIC bằng phương pháp pha loãng kháng sinh

Kháng sinh được pha loãng trong môi trường theo một dãy nồng độ và xác định nồng độ tối thiểu của kháng sinh ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Phương pháp này bao gồm pha loãng kháng sinh trong môi trường lỏng, vi pha loãng kháng sinh trong môi trường lỏng, pha loãng kháng sinh trong thạch.

Cách thực hiện phương pháp này rất đơn giản, chỉ cần pha loãng kháng sinh trong môi trường thích hợp, sau đó nhỏ vi khuẩn vào và đọc kết quả. Cụ thể sẽ gồm 5 bước.

Bước 1: nuôi cấy vi khuẩn thử nghiệm → lấy vi khuẩn pha thành huyền dịch → pha loãng theo tỉ lệ 1/100.

Bước 2: Chuẩn bị dung dịch kháng sinh.

Bước 3: pha loãng kháng sinh theo tỉ lệ ½ thành 11 ống, ống sau nồng độ bằng ½ ống trước cho đến ông thứ 11.

Bước 4: cho một lượng vi khuẩn nhất định vào các ống trừ ống thứ 11. Ống

này để xác định có ngoại nhiễm hay không. Ống thứ 12 chỉ là nước cũng nhỏ vi khuẩn vào đề kiểm tra vi khuẩn.

Bước 5: nuôi ủ trong điều kiện vô trùng → ống nào không có vi khuẩn phát triển thì cho biết nồng độ kháng sinh cần để tiêu diệt vi khuẩn.

Tuy nhiên, thao tác kỹ thuật trong quá trình thực hiện, nồng độ kháng sinh trong mỗi giếng/đĩa, nồng độ vi khuẩn thử nghiệm phải chính xác.

Hệ thống kháng sinh đồ tự động

Hiện nay còn có hệ thống kháng sinh đồ tự động dựa trên nguyên tắc đo màu, vi khuẩn được làm thành huyền dịch và cho vào thẻ (card), hệ thống tự động: nuôi ủ, đọc kết quả nhờ thay đổi màu/độ đục và biện luận kết quả kháng sinh đồ.

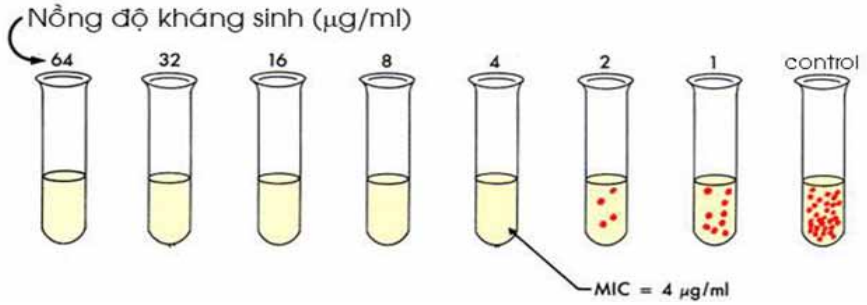
Hệ thống kháng sinh đồ tự động rất tiện lợi, cho kết quả thử nghiệm kháng sinh đồ nhanh chóng có thể dẫn đến những thay đổi kịp thời trong điều trị kháng sinh, tiết kiệm chi phí cho các xét nghiệm bổ sung, nhưng hệ thống kháng sinh đồ tự động cũng có những nhược điểm như có một số loại vi khuẩn hệ thống này sẽ không làm kháng sinh đồ được.

Các loại máy giúp thực hiện kháng sinh đồ tự động có thể kể đến như máy MicroScan WalkAway (hãng Siemens Healthcare Diagnostics), máy BD Phoenix Automated Microbiology System (hãng BD Diagnostics), Vitek 2 System (hãng bioMérieux), máy Sensititre ARIS 2X (hãng Trek Diagnostic Systems). Các loại máy này có thể ủ và phân tích nhiều mẫu trong cùng một lúc (40 – 99 mẫu) với thời gian phân tích từ vài giờ đến một ngày đêm.

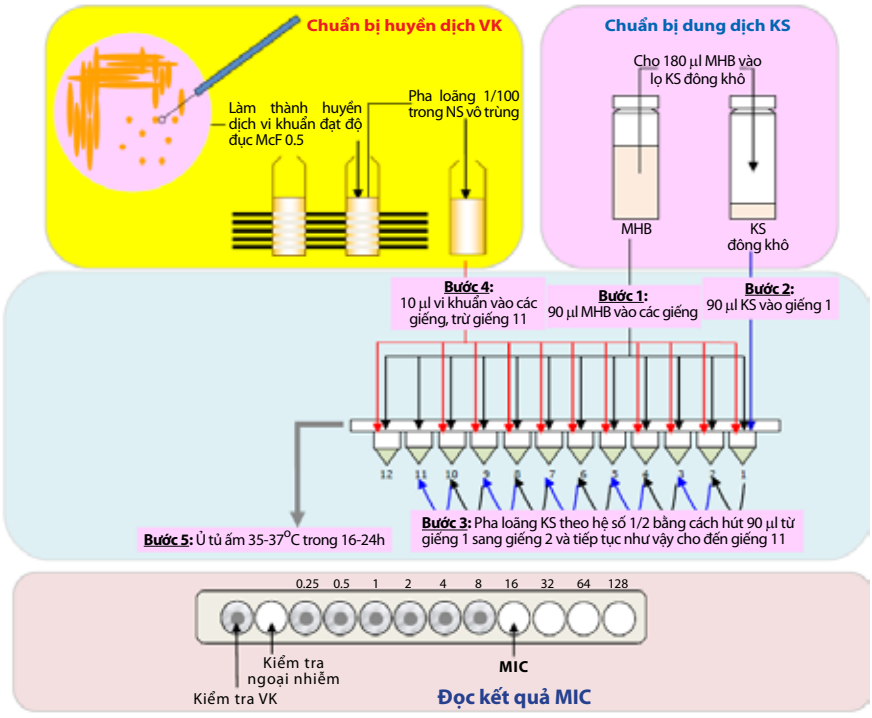
Mặc dù kỹ thuật kháng sinh đồ hiện nay đã có nhiều cải tiến hơn so với trước kia nhưng các tìm tòi về những phương pháp sáng tạo hơn để có thể định danh loại kháng sinh hiệu lực với vi khuẩn vẫn phát triển mạnh mẽ trên khắp thế giới.

Sáng chế (SC) mới về kháng sinh đồ vẫn đang phát triển

SC đầu tiên về kháng sinh đồ được đăng ký ở Mỹ vào năm 1971có tên: Phương pháp và thiết bị phân tích tự



Pha loãng kháng sinh theo tỉ lệ ½, cứ ống sau nồng độ kháng sinh bằng ½ ống đầu.



Quy trình thực hiện kháng sinh đồ xác định MIC bằng phương pháp pha loãng kháng sinh

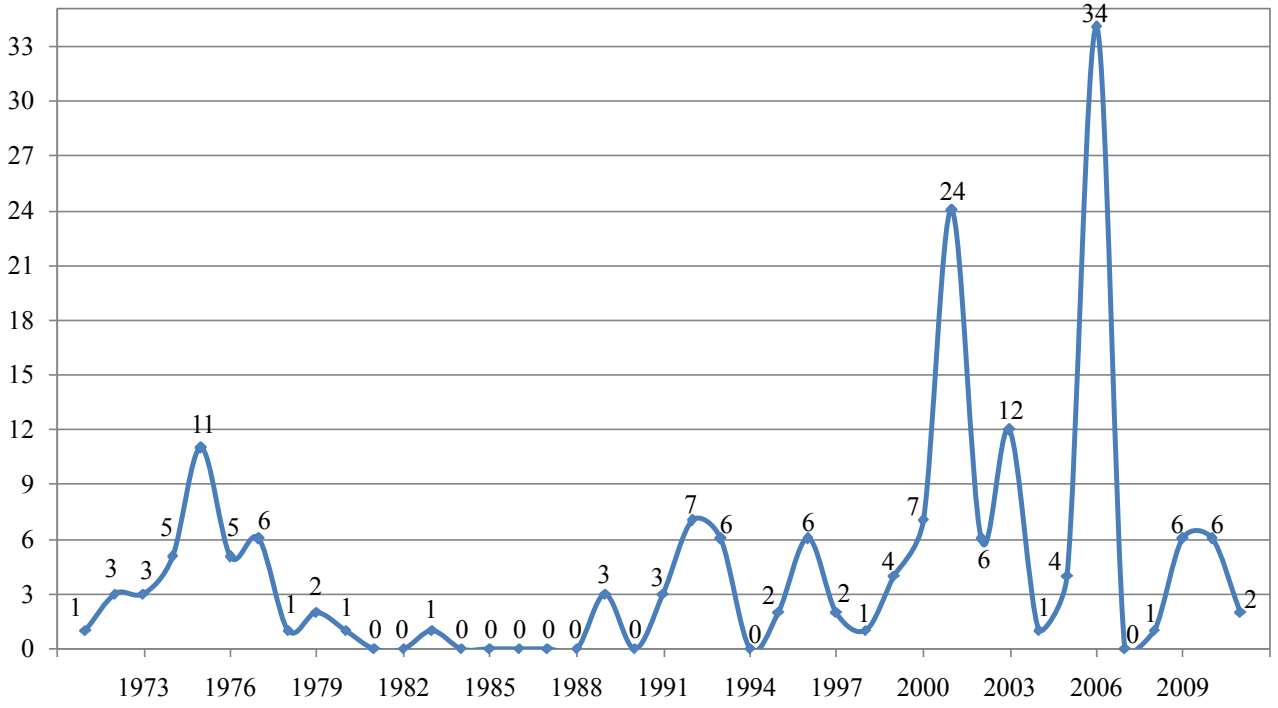
động tính nhạy cảm kháng sinh của các mẫu vi khuẩn theo phương pháp kháng sinh đồ, số SC: US 3772154 của tác giả: Isenberg H, Reichler, Wiseman D. Từ năm 1971-2011 có 12 quốc gia đăng ký SC về kỹ thuật kháng sinh đồ. Trong đó, Mỹ có SC sớm nhất (1971) và lượng SC đăng ký nhiều nhất (69 SC).

Dựa trên dữ liệu SC tiếp cận được, có 3 hướng nghiên cứu được quan tâm nhiều là: các phương pháp và thiết bị để cô lập, xác định vi sinh vật dùng làm vật liệu trong kỹ thuật kháng sinh đồ; áp dụng kỹ thuật kháng sinh đồ trong khảo sát, phân tích, xác định hoạt tính, tính chất lý hóa của thuốc, chế phẩm dược; áp dụng kỹ thuật kháng sinh đồ trong các thử nghiệm hoạt tính enzyme hoặc vi sinh vật, đặc biệt là thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh của vi sinh vật.

Những năm đầu thập niên 70 đã có SC đăng ký liên quan đến kỹ thuật kháng sinh đồ. Tuy nhiên, lượng SC tập trung nhiều từ những năm 1990 đến nay.

Tại Việt Nam, theo dữ liệu SC của Cục Sở hữu trí tuệ Việt Nam, hiện chưa có một SC nào được đăng ký tại Việt Nam về lĩnh vực kháng sinh đồ. Tuy nhiên tại buổi báo cáo phân tích xu hướng công nghệ với chuyên đề "Kỹ thuật vi sinh chuẩn mực để tìm hiểu tình hình đề kháng kháng sinh và các xu hướng SC hiện nay", bác sĩ Phạm Hùng Vân đã giới thiệu một số khả năng SC trong lĩnh vực kháng sinh đồ hiện nay tại Việt Nam như thay đĩa giấy tẩm kháng sinh bằng viên nén có thêm màu, chế tạo thiết bị và phần mềm đo

Số lượng các SC về kháng sinh đồ từ năm 1971 – 2012

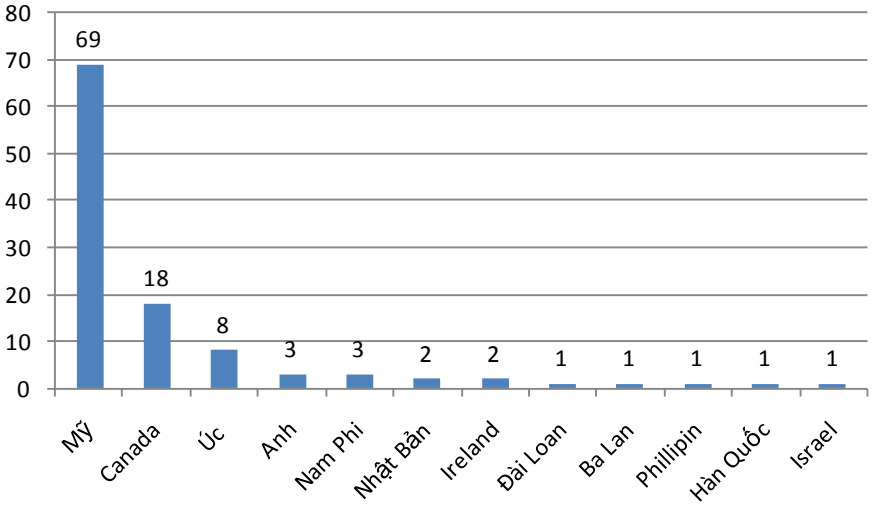


Nguồn: *Wipsglobal*

kết quả đường kính vòng vô khuẩn và biện luận kết quả kháng sinh đồ, que tẩm kháng sinh nồng độ tuyến tính, hộp thạch kháng sinh nồng độ tuyến tính sử dụng trong kháng sinh đồ…Hy vọng trong tương lai, sẽ có nhiều SC về lĩnh vực thú vị này tại Việt Nam. ❐

Bác sĩ Phạm Hùng Vân tại buổi báo cáo chuyên đề "Kỹ thuật vi sinh chuẩn mực để tìm hiểu tình hình đề kháng kháng sinh và các xu hướng SC hiện nay"

Các quốc gia có số lượng SC về kháng sinh đồ cao nhất



Nguồn: *Wipsglobal*

Bài viết được thực hiện dựa trên cơ sở tài liệu của chương trình "Báo cáo phân tích xu hướng công nghệ" tháng 5/2013 tại Trung tâm Thông tin KH&CN TP.HCM (CESTI) với chuyên đề "Kỹ thuật vi sinh chuẩn mực để tìm hiểu tình hình đề kháng kháng sinh và các xu hướng sáng chế hiện nay".

Chương trình "Báo cáo phân tích xu hướng công nghệ" được tổ chức thường xuyên tại CESTI với sự tham gia của các chuyên gia hàng đầu trong từng lĩnh vực và tài liệu phân tích được chuẩn bị chu đáo bởi các chuyên gia và chuyên viên khai thác thông tin, đặc biệt là khai thác thông tin sáng chế tại CESTI. Bạn đọc quan tâm tham dự chương trình "Báo cáo phân tích xu hướng công nghệ" liên hệ đăng ký tại phòng Cung cấp Thông tin, điện thoại: (08) 3824 3826.