

MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT MELAB MUELLER HINTON AGAR

MỤC ĐÍCH SỬ DỤNG

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật MELAB Mueller Hinton Agar là môi trường thường dùng để thực hiện thao tác kháng sinh đồ trong lâm sàng. Được đề xuất bởi CLSI cho kiểm tra sự nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn không khó mọc.

MÔ TẢ SẢN PHẨM

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật MELAB Mueller Hinton Agar là đĩa thạch đồ sẵn, với thành phần giàu dinh dưỡng bao gồm: beef extract và acid hydrolysate của casein cung cấp amino acid, các hợp chất chứa nitơ, vitamin, muối khoáng cần thiết cho phát triển của vi sinh vật, đồng thời có bổ sung kháng sinh chọn lọc. Sự có mặt của tinh bột với tác dụng như một chất keo bảo vệ chống lại các tác nhân gây độc trong môi trường. Thêm vào đó môi trường còn có chứa hàm lượng nhỏ thymidine và thymine như là một chất có thể ức chế ảnh hưởng của sulfonamides và trimethoprim. Nồng độ của các ion hóa trị II trong môi trường thạch nhằm chắc chắn điều khiển các hoạt động của aminoglycosid, tetracycline và colistin được kỳ vọng khi đánh giá *Pseudomonas aeruginosa*.

Sản phẩm được bao gói bằng màng bán thấm Cellophane có tính năng chống ẩm giúp đảm bảo chất lượng trong quá trình bảo quản, dễ dàng phân hủy bảo vệ môi trường.

THÀNH PHẦN CỦA BỘ KIT

Môi trường sử dụng ngay:

Mã sản phẩm	Quy cách
P901490	Hộp 10 đĩa 90mm (2x5)

CÔNG THỨC

Thành phần	Thành phần trong 1 lít nước tinh khiết
Acid Digest of Casein	17.5 g
Beef Extract	2 g
Starch	1.5 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar	17 g

pH 7.3 ± 0.2 ở 25°C

THIẾT BỊ YÊU CẦU

- Tủ ấm
- Tủ an toàn sinh học

CHÚ Ý VÀ CẢNH BÁO

- Dùng cho chẩn đoán *in vitro* và kiểm tra chất lượng vi sinh.
- Tất cả các mẫu xét nghiệm phải được coi là mẫu nhiễm khuẩn và được xử lý thích hợp. Cần tuân thủ kỹ thuật vô khuẩn và các biện pháp phòng ngừa để xử lý các vi khuẩn thực hiện. Tham khảo “CLSI M29-A Protection of Laboratory Workers From occupationally Acquired Infections; Approved Guideline- Current Revision”.
- Không sử dụng môi trường này như là vật tư hoặc nguyên liệu cho sản xuất.
- Không được sử dụng đĩa đã hết hạn sử dụng.
- Không được sử dụng sản phẩm nếu màng đóng gói đã bị tổn hại trước đó.
- Không được sử dụng những đĩa đã bị nhiễm hoặc đĩa đã quá khô.
- Dữ liệu hiệu quả nuôi cấy được chỉ rõ trong hướng dẫn sử dụng này. Bất kì sự thay đổi quy trình thực hiện nào có thể ảnh hưởng tới kết quả.
- Đọc, giải thích kết quả xét nghiệm cần được xem xét từ tiền sử bệnh nhân, nguồn gốc mẫu bệnh phẩm, hình thái khuẩn lạc và hình thái trên kính hiển vi và nếu cần thiết có thể xem xét từ các test khác.

BẢO QUẢN VÀ HẠN SỬ DỤNG

- Bảo quản đĩa thạch trong gói màng bán thấm Cellophane, bên trong hộp giấy. Nhiệt độ bảo quản từ 2 – 8°C, tránh ánh sáng trực tiếp cho tới hết hạn sử dụng. Đĩa thạch sau khi được lấy ra khỏi màng có thể dùng trong 1 tuần tiếp theo ở cùng điều kiện bảo quản. Lưu ý bảo quản vô trùng.
- Các dấu hiệu của sản phẩm hư hỏng: thạch bị co, vỡ, chảy nước từ bên trong môi trường, biến đổi màu sắc, nhiễm. Sản phẩm nhạy cảm với ánh sáng và nhiệt độ do đó cần kiểm soát ánh sáng, quá nhiệt, độ ẩm cao, đông đá.
- Hạn sử dụng: 80 ngày kể từ ngày sản xuất.

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

Chú ý: Sử dụng Môi trường nuôi cấy vi sinh vật MELAB Mueller Hinton Agar cho kiểm tra thông thường với vi khuẩn không khó mọc.

1. Thực hiện phương pháp thử thích hợp để xác nhận phán đoán của phép thử là độc lập.
2. Để các đĩa và khoanh kháng sinh ổn định tại nhiệt độ phòng trước khi sử dụng. Bề mặt thạch không nên quá ướt hoặc quá khô trước khi cấy.

3. Việc tiêm chủng có thể sử dụng được chuẩn bị trước bởi phương pháp tăng sinh hoặc phương pháp lựa chọn khuẩn lạc trực tiếp.

Phương pháp tăng sinh:

- Chọn tối thiểu 3-5 khuẩn lạc có kiểu hình thái tương đồng từ môi trường thạch. Dùng que cấy gạt trên bề mặt mỗi khuẩn lạc sau đó chuyển vào ống chứa 4-5ml môi trường lỏng thích hợp như là Tryptic Soy Broth.
- Nuôi ủ canh trường lỏng tại 35-37°C cho đến khi độ đục đạt đến hoặc vượt qua độ đục chuẩn 0.5 Mcfarland.
- Nếu cần thiết, thay đổi độ đục của dịch huyền phù với saline hoặc môi trường lỏng broth để đạt được độ đục tiêu chuẩn. Bước này có thể thực hiện bằng nhìn trực quan hoặc sử dụng thiết bị đo độ đục. Nếu nhìn trực quan, sử dụng dưới ánh sáng đầy đủ để có thể so sánh giữa ống chứa dịch huyền phù và ống McFarland tiêu chuẩn với một nền trắng và đường tương phản màu đen.

Phương án chọn khuẩn lạc trực tiếp:

(Phương pháp thường được chọn cho các loài *Streptococcus* và *Staphylococcus*)

- Từ canh trường đã có sẵn nuôi trong môi trường không chọn lọc 18h - 24h, tiến hành pha dịch huyền phù trực tiếp của chủng vi sinh vật cần thực hiện kiểm tra vào trong saline.
 - Điều chỉnh độ đục của dịch huyền phù như miêu tả ở các bước trong “Phương pháp tăng sinh”.
4. Trong vòng 15 phút cấy huyền dịch đã chuẩn bị lên bề mặt thạch.
 5. Nhúng tấm bông vô trùng nhúng vào huyền dịch mẫu, ép nhẹ và xoay theo chiều cao của ống ở trên mức chất lỏng, để loại bỏ chất lỏng dư thừa thấm vào tấm bông.
 6. Cấy rìa đều tấm bông trên bề mặt của đĩa thạch trong 3 chiều bởi xoay đĩa thạch gần 60° mỗi lần cấy.
 7. Để đĩa thạch khô tự nhiên trong box cấy ít nhất 3 phút và không được quá 15 phút nhằm mục đích để chủng cấy hấp thụ vào bề mặt thạch trước khi đặt các khoanh kháng sinh.
 8. Dùng pank kẹp đặt các khoanh kháng sinh riêng rẽ lên bề mặt đĩa thạch. Khoảng cách của từ mép đĩa thạch đến tâm của mỗi khoanh kháng sinh là 15mm, khoảng cách giữa tâm của hai khoanh kháng sinh gần nhau ít nhất 24 mm. Không đặt quá 5 khoanh trên một đĩa thạch đường kính 90 mm. Không nên xê dịch hoặc đặt lại vị trí của các khoanh kháng sinh bởi vì tác dụng khuếch tán của kháng sinh gần như là ngay lập tức. Dùng que cấy vô trùng ấn nhẹ khoanh kháng sinh để đảm bảo chúng tiếp xúc hoàn toàn với bề mặt thạch.
 9. Trong vòng 15 phút sau khi đặt khoanh kháng sinh, mang đĩa thạch nuôi ủ với điều kiện thích hợp, khuyến cáo từ 35-37°C trong 16-18h. Lật ngược đĩa khi nuôi ủ. Khả năng kháng methicillin của *Staphylococcus* có thể không thể hiện tại nhiệt độ nuôi ủ lớn hơn 35°C

ĐỌC KẾT QUẢ

- Sau khi ủ theo thời gian yêu cầu, quan sát khuẩn lạc phát triển trên bề mặt đĩa và các vòng ức chế tròn, đồng nhất xung quanh các khoanh kháng sinh
- Để định danh của vi khuẩn phân lập được phải được tiến hành tiếp theo bởi các test thích hợp. Nếu các khuẩn lạc riêng rẽ còn xuất hiện thì cần phải thực hiện kiểm tra lại.
- Lật ngược đĩa lại, giơ trước ánh sáng, nhìn vào mặt đáy của đĩa, sử dụng thước kẹp chia vạch tới milimet để đo đường kính các vòng ức chế hoàn chỉnh (bao gồm cả khoanh kháng sinh). Đường viền của vòng ức chế nên được đọc từ khu vực mà không phát hiện được sự phát triển của vi khuẩn bằng mắt thường. Các vi khuẩn có khuẩn lạc mờ nhạt hoặc khuẩn lạc bé tại viền của vòng ức chế sinh trưởng chỉ có thể nhìn được khi phóng đại thì nên bỏ qua.
- Để giải thích cho vùng ức chế, tham khảo CLSI M100 cho mỗi chủng vi sinh vật.

KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM

MELAB Diagnostic kiểm tra chất lượng theo tiêu chuẩn nhà sản xuất đáp ứng yêu cầu kiểm soát chất lượng tối thiểu theo khuyến cáo của CLSI bằng các chủng chuẩn sau đây:

Chủng chuẩn	Điều kiện ủ	Kết quả mong đợi (Theo CLSI)	
		Kháng sinh	Vùng ức chế
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	16-18h, 35-37°C, hiếu khí	Ampicillin 10 µg	15-22mm
		Gentamicin 10 µg	19-26mm
		Nitrofurantoin 300 µg	20-25mm
		Trimethoprim/ Sulfamethoxazole 25 µg	23-29mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	16-18h, 35-37°C, hiếu khí	Gentamicin 10 µg	17-23mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	16-18h, 35-37°C, hiếu khí	Ampicillin 10 µg	27-35mm
		Gentamicin 10 µg	19-27mm
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	16-18h, 35-37°C, hiếu khí	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole 25 µg	≥20mm

Lưu ý :

Trách nhiệm của người sử dụng là thực hiện kiểm tra chất lượng có tính đến mục đích sử dụng của môi trường và phù hợp với bất kỳ quy định của địa phương (tần số, số lượng chủng, nhiệt độ ủ,...)

HẠN CHẾ

- Môi trường này không sử dụng cho các vi khuẩn kỵ khí, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* hoặc các vi sinh vật gây bệnh khác không có trong danh sách hiện tại của CLSI.
- Phòng xét nghiệm lâm sàng nên thường xuyên kiểm tra quy trình cho các lỗi kỹ thuật có thể gây tác động không tốt tới tính chính xác của kết quả khuếch tán. Một số lỗi được liệt kê như : bảo quản khoanh kháng sinh không đúng, cấy chủng điều chỉnh nồng độ không đúng, điều kiện nuôi ủ không đúng nhiệt độ, thời gian, khí trường, đo đặc và diễn giải không đúng đường kính vòng ức chế, nhiễm tạp hoặc xảy ra đột biến với chủng được xét nghiệm.
- Một vài sự kết hợp giữa vi sinh vật – chất kháng sinh không được báo cáo cho tính nhạy cảm gây kết quả sai lầm. Tham khảo CLSI và các tiêu chuẩn tham khảo cho các báo cáo hướng dẫn cụ thể cho mỗi cặp vi sinh vật – chất kháng sinh.

LOẠI BỎ RÁC THẢI

- Các môi trường không sử dụng có thể được xem như rác thải không nguy hiểm và loại bỏ theo quy định. Loại bỏ tất cả các môi trường đã sử dụng theo quy trình cho các sản phẩm nhiễm trùng hoặc tiềm ẩn gây nhiễm
- Xử lý và loại bỏ rác thải và nước thải theo quy định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

“Tiêu chuẩn hiệu năng cho thử nghiệm nhạy cảm với môi trường kháng sinh đồ” theo tiêu chuẩn của CLSI. Tham khảo:

1. “*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*” (CLSI M100-Ed35 January 2025)
2. “*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*” (CLSI M02-Ed14 March 2024)