

VALIDATION OF KLEBSIELLA OXYTOCA TEST IN MICE BY CULTURE METHOD

Hoang Trung Hung*, Nguyen Chi Hieu, Tran Thi Hong, Quach Thu Thao, Tran Thi
Huong Thom, Man Thi Thanh, Nguyen Dang Khue

National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

Received 10 October 2024

Accepted 09 December 2024

Abstract: Process validation is one of the important steps to assess the suitability and confirm the validity of the method, to ensure the reliability of the test results. *Klebsiella oxytoca* is a Gram-negative bacteria that causes opportunistic disease in humans and rodents, often found in the digestive tract and can grow well in culture media. This study was conducted to validate the process of identifying *Klebsiella oxytoca* in ICR white mice by culturing on DHL, MacConkey, SIM, blood agar, Ure indole medium, Oxydase test and identifying with the bacterial identification machine BD Phoenix. The study used the experimental descriptive method in the laboratory. The process of identifying *Klebsiella oxytoca* was optimized based on the testing process of the Laboratory Animal Center of Mahidol University, Thailand, which is AAALAC certified. Therefore, the evaluation was conducted in part with two criteria: Specificity and strength.

Keywords: *Klebsiella oxytoca*, culture, rodents.

* Corresponding author

E-mail address: Hthung210394@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v4i4.188>

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH KIỂM TRA *KLEBSIELLA OXYTOCA* TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY

Hoàng Trung Hưng*, Nguyễn Chí Hiếu, Trần Thị Hồng, Quách Thu Thảo, Mẫn Thị Thành,
Trần Thị Hương Thơm, Nguyễn Đăng Khuê

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, Bộ Y tế

Nhận ngày 10 tháng 10 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 09 tháng 12 năm 2024

Tóm tắt: Thẩm định quy trình là một trong những bước quan trọng để đánh giá sự phù hợp cũng như xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp, nhằm đảm bảo độ tin cậy cho kết quả thử nghiệm. *Klebsiella oxytoca* là vi khuẩn Gram âm gây bệnh cơ hội trên người và động vật gặm nhấm, thường được phát hiện trong đường tiêu hóa và có thể phát triển tốt trên các môi trường nuôi cấy. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác nhận quy trình nhận diện tác nhân *Klebsiella oxytoca* trên chuột nhắt trắng ICR bằng phương pháp nuôi cấy trên các môi trường thạch DHL, MacConkey, SIM, thạch máu, môi trường Ure indol medium, thử phản ứng Oxydase và định danh bằng máy định danh vi khuẩn BD Phoenix (mã quản lý NICVB – BS01-TN). Nghiên cứu sử dụng phương pháp mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm. Quy trình nhận diện tác nhân *Klebsiella oxytoca* đã được tối ưu hóa dựa trên quy trình xét nghiệm của Trung tâm động vật thí nghiệm thuộc trường đại học Mahidol, Thái Lan đạt chứng nhận AAALAC. Vì vậy, thẩm định được tiến hành một phần gồm hai tiêu chí: Độ đặc hiệu và độ mạnh.

Từ khóa: Klebsiella oxytoca, nuôi cấy, động vật gặm nhấm

1. Đặt vấn đề

Sự xuất hiện của các tác nhân gây bệnh trong các cơ sở chăn nuôi hoặc động vật thí nghiệm làm nổi bật nhu cầu giám sát sức khỏe động vật vì nó ảnh hưởng trực tiếp đến phúc lợi động vật, tính ổn định của thí nghiệm và các dự án nghiên cứu khoa học. Việc sử dụng động vật có đặc điểm sinh học đã biết là rất quan trọng để đảm bảo giá trị của các kết quả thí nghiệm [1]. Một số nhóm vi sinh vật gây nhiễm trùng ở loài gặm nhấm và thỏ nhưng không có các dấu hiệu lâm sàng rõ

ràng. Do đó, việc chẩn đoán bệnh qua các triệu chứng lâm sàng là rất hạn chế. Các trường hợp nhiễm trùng trên động vật thí nghiệm có thể làm sai lệch kết quả khoa học, làm tăng sự thay đổi về mặt sinh học và kết quả thử nghiệm và làm gia tăng việc sử dụng động vật. Sự nhiễm vi sinh vật trên các vật liệu sinh học như khối u, dòng tế bào và huyết thanh hoặc phôi và giao tử có thể xảy ra do nhiễm trùng tiềm ẩn ở động vật. Một số bệnh nhiễm trùng ở động vật thí nghiệm cũng có thể lây nhiễm cho người (bệnh truyền từ động

vật sang người). Vì những lý do trên, liên đoàn các hiệp hội động vật thí nghiệm Châu Âu (FELASA) khuyến cáo cần thiết xây dựng một chương trình giám sát sức khỏe động vật thí nghiệm như một phần tích hợp của bất kỳ hệ thống đảm bảo chất lượng nào [2].

Klebsiella oxytoca là một loại trực khuẩn Gram âm gây bệnh cơ hội, thường được phát hiện trong đường ruột. Khi cơ thể vật chủ bị suy giảm miễn dịch, *Klebsiella oxytoca* có thể gây viêm phổi sinh mủ nặng, nhiễm trùng huyết, viêm đường tiết niệu ở người và động vật gặm nhấm với tỷ lệ tử vong cao nếu không được điều trị [3]. Do việc cách ly, loại bỏ nhiều tác nhân gây bệnh chính trong các đàn động vật thí nghiệm trong những thập kỷ qua, tình trạng nhiễm vi sinh của động vật được sử dụng trong nghiên cứu đã được cải thiện đáng kể. Tuy nhiên, bằng cách nuôi duy trì động vật trong điều kiện vệ sinh tốt (không có tác nhân gây bệnh cụ thể) khiến các tác nhân gây bệnh cơ hội ngày càng trở nên quan trọng như các tác nhân gây ra bệnh lâm sàng và tổn thương bệnh lý ở động vật thí nghiệm [3].

Klebsiella oxytoca đóng vai trò quan trọng cần giám sát định kỳ để đảm bảo sức khỏe đàn động vật trước khi ghép sinh sản hoặc đưa vào thử nghiệm [2]. Hiện nay, có 3 phương pháp phổ biến để nhận diện các tác nhân vi sinh vật gồm: Phương pháp nuôi cấy, phương pháp miễn dịch và phương pháp sinh học phân tử. Tùy từng điều kiện cụ thể của mỗi đơn vị có thể lựa chọn phương pháp nhận

diện thích hợp. Tại phòng xét nghiệm của khoa Động vật Thực nghiệm, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB) sử dụng phương pháp nuôi cấy, phân lập và định danh bằng máy định danh vi khuẩn BD phoenix dựa trên quy trình xét nghiệm của Trung tâm động vật thí nghiệm thuộc trường đại học Mahidol, Thái Lan đạt chứng nhận AAALAC. Từ đó, chúng tôi tiến hành thẩm định một phần với mục đích xác nhận quy trình nhận diện tác nhân vi khuẩn phù hợp sử dụng tại NICVB với hai tiêu chí: Độ đặc hiệu và độ mạnh.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Quy trình kiểm tra *Klebsiella oxytoca* trên chuột nhắt trắng bằng phương pháp nuôi cấy.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Khoa Động vật Thực nghiệm, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 3 năm 2022 đến tháng 12 năm 2022

2.3. Nguyên vật liệu, thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

2.3.1. Mẫu thử

- Chuột nhắt ICR 3-4 tuần tuổi, khỏe mạnh, được giám sát sức khỏe định kỳ theo danh mục khuyến cáo của FELASA, không nhiễm tác nhân *Klebsiella oxytoca*.

2.3.2. Mẫu chuẩn

- Chủng chứng dương *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131

- Chủng chứng âm *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

- Nước muối sinh lý pha tiêm IVAC

2.3.3. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất

- Thiết bị: Tủ an toàn sinh học cấp 2 (mã quản lý: LH27-TN); Kính hiển vi (mã quản lý: MS17-TN); Tủ ẩm (mã quản lý: IC33-TN); Tủ bảo quản mẫu (mã quản lý: CI26-TN); Máy định danh vi khuẩn BD Phoenix (mã quản lý: BS01-TN); micropipet các loại đã được hiệu chuẩn, bảo dưỡng hàng năm theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025.

- Môi trường, hóa chất: Thạch DHL, thạch máu, thạch MacConkey, thạch SIM, môi trường Ure indol medium, dung dịch TSB, bộ nhuộm Gram.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu mô tả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.5. Nội dung nghiên cứu

2.5.1. Tóm tắt quy trình nghiên cứu

a/ Chuẩn bị

Chuẩn bị phòng xét nghiệm, môi trường, dụng cụ và động vật cho quy trình thẩm định.

b/ Nuôi cấy tăng sinh

Cấy mẫu thử, chủng âm và chủng dương trên môi trường nuôi cấy:

- Mẫu thử: Phân lấy trực tiếp từ manh tràng chuột ngay sau khi mổ khám trộn với chủng *Klebsiella oxytoca* được phết một lượng nhỏ lên bề mặt thạch DHL, dùng

que cấy 1 lần trộn đều sau đó ria cấy các đường cơ sở.

- Chủng âm: Đối với nước muối sinh lý, dùng que cấy một lần chấm vào nước muối sinh lý rồi cấy lên môi trường DHL, thạch máu, MacConkey, SIM, Ure indole medium; Đối với chủng *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, dùng que cấy một lần lấy một vòng dung dịch vi khuẩn đã pha loãng đến nồng độ 10^2 CFU/ml ria cấy trên môi trường thạch DHL.

- Chủng dương: Sử dụng chủng *Klebsiella oxytoca*, dùng que cấy một lần lấy một vòng dung dịch vi khuẩn đã pha loãng đến nồng độ 10^2 CFU/ml ria cấy trên môi trường thạch DHL.

+ Ủ trong tủ ẩm 37°C ; theo dõi sau 18- 24 giờ;

+ Nhuộm Gram: vi khuẩn bắt màu Gram âm, hình que, mảnh, thẳng hoặc hơi cong, hai đầu tròn.

c/ Cấy thuần vào môi trường thạch máu

Nếu tính chất mọc trên môi trường DHL và kết quả nhuộm Gram đặc trưng, tiến hành cấy thuần vi khuẩn trên thạch máu; đặt trong tủ ẩm 37°C . Ủ và theo dõi sau 18-24 giờ.

d/ Nuôi cấy phân lập

- Mẫu thử: Chọn những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc đặc trưng trên thạch máu (khuẩn lạc nhầy, màu trắng xám, không làm tan huyết kích thước khoảng 2mm), trực khuẩn Gram (-); tiến hành cấy chuyển trên môi trường MacConkey, SIM, Urea

indole medium sau đó đặt trong tủ ấm 37°C, thử phản ứng oxydase (-). Ủ và theo dõi sau 18-24 giờ.

- Chứng âm: Cây chủng *Pseudomonas aeruginosa*, tiến hành thao tác như mẫu thử. Chọn những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc đặc trưng trên thạch máu (khuẩn lạc dạng R, màu xám xanh nhạt, kích thước 3-4mm, tan huyết dạng β), trực khuẩn Gram âm; phản ứng oxydase (+), tiến hành cấy chuyển trên môi trường MacConkey, SIM, Urea indol medium sau đó đặt trong tủ ấm 37°C. Ủ và theo dõi sau 18-24 giờ.
- Chứng dương: Chủng vi khuẩn *Klebsiella oxytoca*, chọn những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc đặc trưng trên thạch máu (khuẩn lạc nhày, màu trắng xám, không làm tan huyết kích thước khoảng 2mm), trực khuẩn Gram (-); tiến hành cấy chuyển trên môi trường MacConkey, SIM, Urea indol medium sau đó đặt trong tủ ấm 37°C, thử phản ứng oxydase (-). Ủ và theo dõi sau 18-24 giờ.

e/ Định danh vi sinh vật để khẳng định

- Tìm những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc đặc trưng trên môi trường MacConkey (khuẩn lạc dạng S, màu hồng) để tiến hành định danh bằng máy định danh vi sinh vật BD Phoenix.
- Chứng âm: nước muối sinh lý; *Pseudomonas aeruginosa*.
- Chứng dương: Chủng vi khuẩn *Klebsiella oxytoca*.

f/ Đánh giá kết quả

- Mẫu thử của động vật kiểm tra dương tính đối với *Klebsiella oxytoca* có dấu hiệu phát triển của *Klebsiella oxytoca* với các khuẩn lạc đặc trưng trên các môi trường nuôi cấy: Xuất hiện khuẩn lạc tròn, lồi, trơn, nhẵn, màu hồng phấn, kích thước 2-3mm trên thạch DHL; Khuẩn lạc nhày, màu trắng xám, không làm tan huyết kích thước khoảng 2mm trên thạch máu; Khuẩn lạc có màu hồng trên thạch MacConkey; Vi khuẩn di động trong ống thạch SIM; Phản ứng dương tính cho vòng màu đỏ trên môi trường Urea indole medium; Phản ứng âm tính với phản ứng oxydase; Nhuộm Gram vi khuẩn bắt màu Gram âm, hình dáng trực khuẩn; Định danh bằng máy định danh BD phoenix cho kết quả là *Klebsiella oxytoca*.

2.5.2. Thiết kế nghiên cứu

Phương pháp tiêu chuẩn, thẩm định một phần, các tiêu chí thẩm định: Độ đặc hiệu, độ mạnh.

a. Độ đặc hiệu

Bố trí thí nghiệm:

- Thử nghiệm thẩm định được đánh giá trên mẫu thử lấy từ 10 chuột nhất trắng 3 - 4 tuần tuổi khỏe mạnh, được giám sát sức khỏe định kỳ, đảm bảo không nhiễm tác nhân *Klebsiella oxytoca*, thực hiện song song với mẫu chứng dương là chủng *Klebsiella oxytoca* mã chủng 49131 và mẫu chứng âm là mẫu chỉ cấy nước muối sinh lý và chủng *Pseudomonas aeruginosa* mã chủng ATCC 9027.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

- Chứng âm đạt yêu cầu:

+ Đĩa thạch cây *P.aeruginosa* có khuẩn lạc mọc khác biệt với chứng dương. Trên DHL khuẩn lạc màu nhợt nhạt, kích thước 2-3mm; trên thạch máu khuẩn lạc màu trắng, tan máu β ; trên thạch SIM có dấu hiệu di động, không có phản ứng với môi trường Ure indole medium.

+ Đĩa thạch cây nước muối sinh lý: Không có dấu hiệu phát triển của bất kỳ vi khuẩn nào trên môi trường được nuôi cấy.

- Chứng dương đạt yêu cầu:

+ Trên môi trường đặc hiệu

- DHL: Sau 18-24h quan sát trên thạch để tìm khuẩn lạc đặc trưng: khuẩn lạc *K.oxytoca* đặc trưng có màu hồng phấn, nhày, kích thước 2-3mm.
- BA: Sau 18-24h, Trên thạch máu: Khuẩn lạc nhày, màu trắng xám, không làm tan huyết kích thước khoảng 2mm.
- MacConkey: khuẩn lạc *K.oxytoca* có màu hồng.
- Thạch SIM: đặc tính di động.
- Ure indole medium: Có vòng phản ứng màu đỏ.

+ Kết quả định danh bằng máy định danh vi sinh vật BD Phoenix là vi khuẩn *Klebsiella oxytoca*

- Mẫu thử đạt tiêu chuẩn: Phát hiện khuẩn lạc tương ứng với *K.oxytoca* ở tất cả các lần thử nghiệm

+ Trên môi trường đặc hiệu

- DHL: Sau 18-24h quan sát trên thạch để tìm khuẩn lạc đặc trưng: khuẩn lạc *K.oxytoca* đặc trưng có màu hồng phấn, nhày, kích thước 2-3mm.

- BA: Sau 18-24h, Trên thạch máu: Khuẩn lạc nhày, màu trắng xám, không làm tan huyết kích thước khoảng 2mm.
- MacConkey: khuẩn lạc *K.oxytoca* có màu hồng.
- Thạch SIM: đặc tính di động.
- Ure indole medium: Có vòng phản ứng màu đỏ.

+ Kết quả định danh bằng máy định danh vi sinh vật BD Phoenix là vi khuẩn *Klebsiella oxytoca*

b. Độ mạnh

Bố trí thí nghiệm:

- 02 nhóm thực hiện trên mẫu bệnh phẩm với mẫu chứng dương là chủng *K.oxytoca* và mẫu chứng âm là nước muối sinh lý và chủng *P.aeruginosa*. Thử nghiệm lặp lại 6 lần trong các ngày khác nhau, khác loại hoá chất.

Tiêu chuẩn chấp thuận:

- Kết quả thực hiện tại 6 lần tương đồng giữa 2 nhóm làm việc trong tất cả các lần xét nghiệm, chứng dương, chứng âm đều định danh được là vi khuẩn *Klebsiella oxytoca* và chứng âm là vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*.

2.6. Phương pháp phân tích số liệu

Phân tích thống kê xử lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. Kết quả

3.1. Độ đặc hiệu

Bảng 1. Kết quả tiêu chí độ đặc hiệu

Lần thực hiện	Mẫu	Chứng âm	Chứng dương
1	Dương tính 100%	Âm tính	Dương tính
2	Dương tính 100%	Âm tính	Dương tính
3	Dương tính 100%	Âm tính	Dương tính
4	Dương tính 100%	Âm tính	Dương tính
5	Dương tính 100%	Âm tính	Dương tính
6	Dương tính 100%	Âm tính	Dương tính

- Từ bảng trên cho thấy tất cả mẫu thử, ở cả 6 lần thực hiện khác nhau đều dương tính với vi khuẩn *K. oxytoca*. Tất cả các môi trường nuôi cấy chủng *K. oxytoca* đều phát triển khuẩn lạc đặc trưng, chủng *P. aeruginosa* phát triển tốt trên môi trường thạch máu, DHL, MacConkey, SIM, trong khi tất cả môi trường chứng âm cấy nước muối sinh lý đều không có sự phát triển của vi sinh vật. Từ đó cho thấy các mẫu thử và đối chứng đều đạt yêu cầu của thử nghiệm.



Hình 1. Mẫu thử trên môi trường DHL. Khuẩn lạc đặc trưng dạng S, có màu hồng phấn, nhày, kích thước 2-3mm.



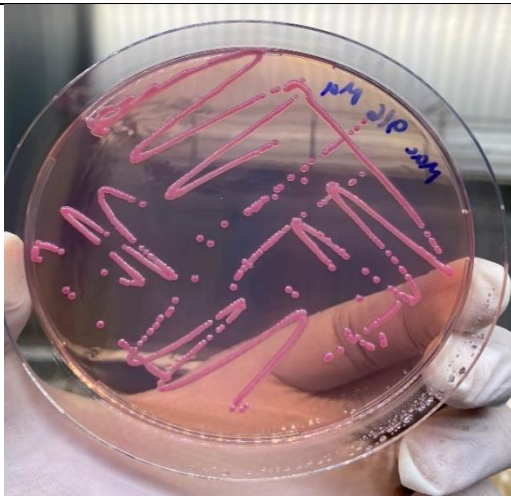
Hình 2. *P. aeruginosa* trên môi trường DHL. Khuẩn lạc đặc trưng dạng R, có màu nhạt, nhày, kích thước 2-3mm.



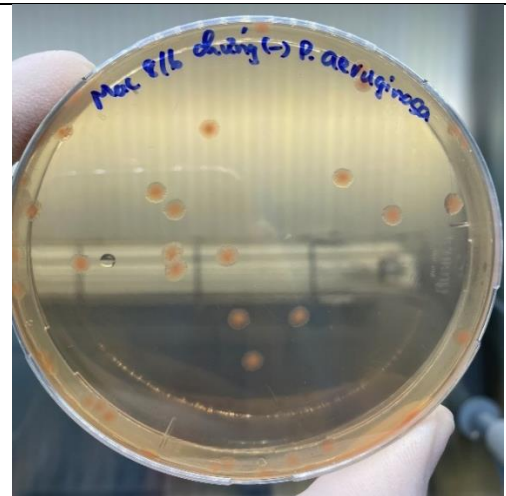
Hình 3. *K.oxytoca* trên môi trường BAB. Khuẩn lạc nhầy, màu trắng xám, không làm tan huyết, kích thước khoảng 2mm.



Hình 4. *P.aeruginosa* trên môi trường BAB. Khuẩn lạc màu trắng, làm tan huyết β , kích thước 3-4mm.



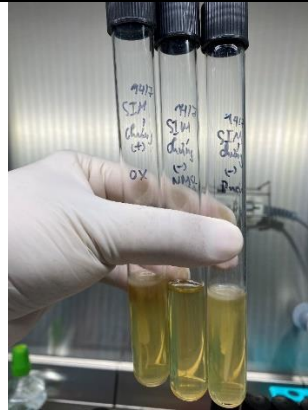
Hình 5. *K.oxytoca* trên môi trường MacConkey. Khuẩn lạc có màu hồng phấn



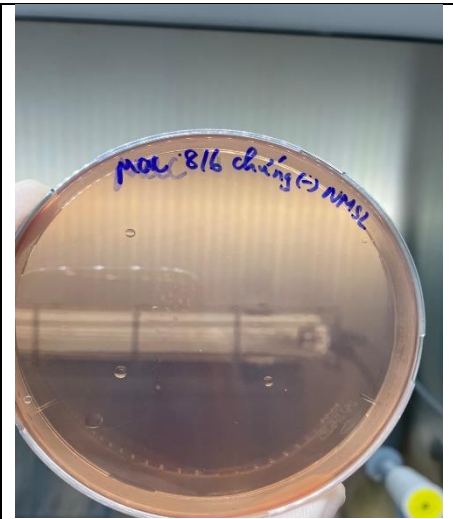
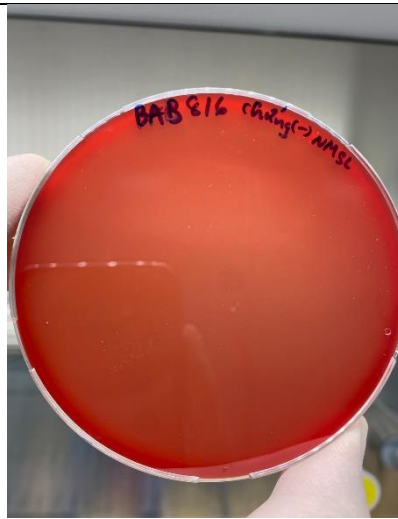
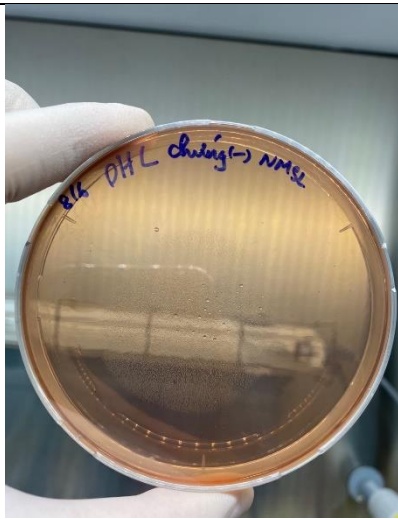
Hình 6. *P.aeruginosa* trên môi trường MacConkey. Khuẩn lạc đặc trưng dạng R, màu nhợt nhạt



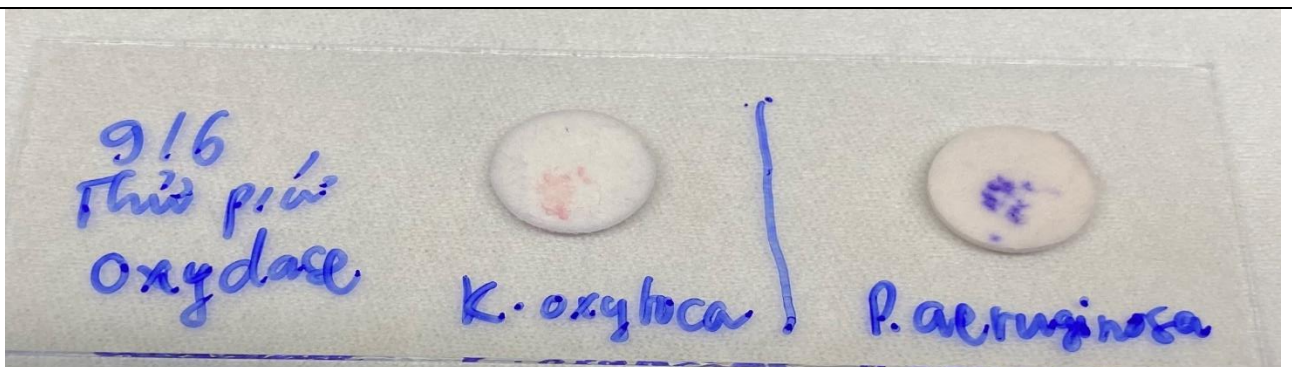
Hình 7. Từ trái qua phải: Chứng âm cấy *P.aeruginosa*, chứng âm cấy nước muối sinh lý không làm đổi màu môi trường Ure - indol, chứng dương nuôi cấy vi khuẩn *K.oxytoca* đổi màu môi trường Ure indole medium sang màu hồng



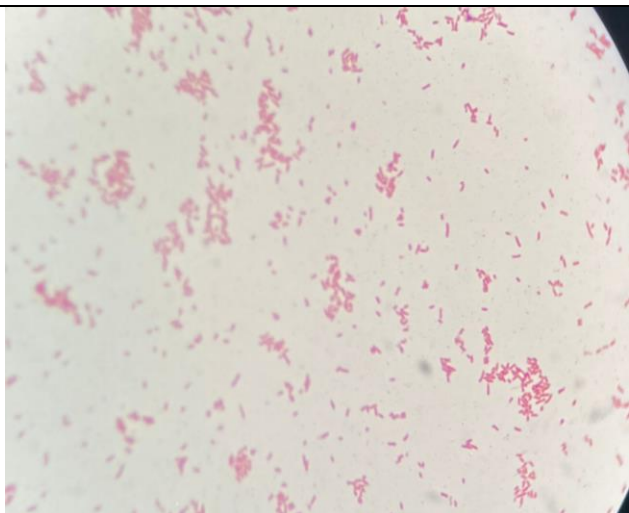
Hình 8. Từ trái qua phải: Chứng dương cây *K.oxytoca* di động trong môi trường thạch SIM, chứng âm cây nước muối sinh lý không có sự phát triển của vi khuẩn, chứng âm nuôi cấy vi khuẩn *P.aeruginosa* tạo thành màng trên bề mặt môi trường, vi khuẩn di động, phát triển lan ra ngoài đường cấy



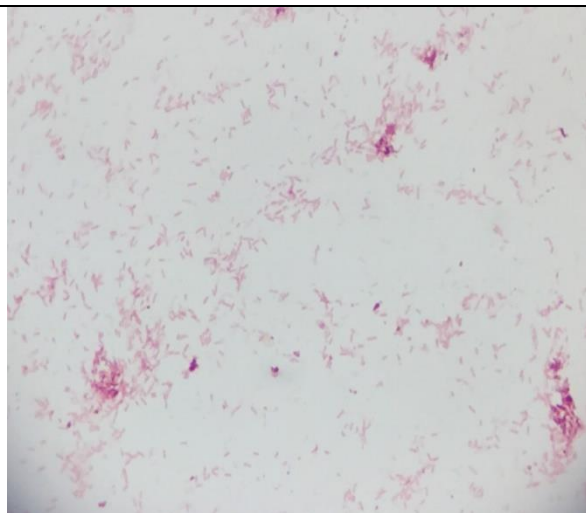
Hình 9. Chứng âm cây nước muối sinh lý đạt tiêu chuẩn, không phát hiện sự phát triển của vi sinh vật trong quá trình thử nghiệm



Hình 10. Phản ứng oxydase: *K.oxytoca* âm tính không làm đổi màu thuốc thử, *P.aeruginosa* dương tính làm đổi màu thuốc thử sang màu xanh



Hình 11. Hình ảnh nhuộm Gram vi khuẩn *K. oxytoca*. Trục khuẩn hình que gậy, bắt màu Gram âm



Hình 12. Hình ảnh nhuộm Gram vi khuẩn *P.aeruginosa*. Trục khuẩn hình que mảnh, bắt màu Gram âm nhạt

Báo cáo xét nghiệm

10/06/2022 13:58
2.20.0.0 / V6.81A (x-US)

Mã bệnh phẩm	0806k.oxytoca	Bắt đầu xét nghiệm	09/06/2022 09:49
Số phân lập	1	Kết thúc xét nghiệm	09/06/2022 23:26
Mã trình tự panel	500270491735	Vị trí	1/C06
Loại panel	NMIC/ID-504	Đã kết luận	Không
Tình trạng	HOÀN THÀNH		

Kết quả DD cuối cùng: *Klebsiella oxytoca* Mật độ cấy: 0.5

(Các) mã thiết bị: *Klebsiella oxytoca* Giá trị độ tin cậy: 99%

Sinh hóa	Thực tế	Mong đợi	Sinh hóa	Thực tế	Mong đợi	Sinh hóa	Thực tế	Mong đợi
A_ARARR	+	V	A_GLPRB	-	-	A_GLYB	-	-
A_GUGAH	-	-	A_LARGH	-	-	A_LGTA	+	+
A_LLEUH	+	V	A_LPHET	-	-	A_LPROB	-	-
A_LPYR	-	V	A_LTRY	-	-	A_LYALD	-	V
C_ACT	-	-	C_ADO	-	V	C_CIT	+	V
C_CLST	-	-	C_DMNT	+	+	C_KGA	-	V
C_MLO	-	V	C_PXB	-	-	C_TIG	-	-
M_NAS	-	-	N_LGGH	-	V	N_LPROT	-	-
P_BOGLU	+	+	P_BPHO	+	V	R_BALL	+	+
R_BGEN	+	V	R_DEX	+	+	R_DFRU	+	+
R_DGAL	+	+	R_DGUA	+	+	R_DMLB	+	+
R_DSBT	+	+	R_DSUC	+	+	R_GRA	+	+
R_LARA	+	+	R_LRHA	+	+	R_MBGU	+	+
R_MTU	+	+	R_NGA	-	V	R_NGU	+	+
S_ORN	-	-	S_URE	-	V	T_ESC	+	+

Hình 13. Kết quả định danh vi khuẩn *Klebsiella oxytoca* bằng máy định danh vi sinh vật BD Phoenix M50

3.2. Độ mạnh

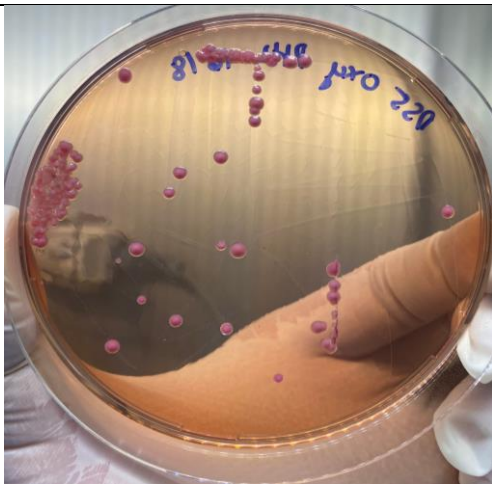
Thử nghiệm thẩm định quy trình kiểm tra *Klebsiella oxytoca* trên 10 chuột nhắt trắng 3 - 4 tuần tuổi khỏe mạnh, được giám sát sức khỏe định kỳ, đảm bảo không nhiễm tác nhân *Klebsiella oxytoca* được thực hiện 6 lần vào 6 thời điểm khác nhau, trong cùng điều kiện và thực hiện song song giữa hai nhóm. Kết quả của tiêu chí độ đặc hiệu được tổng hợp tại bảng 2.

Bảng 2. Kết quả tiêu chí độ mạnh

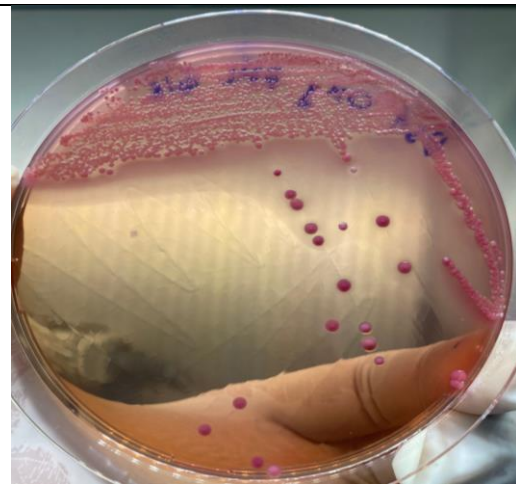
Lần thực hiện	Nhóm 1	Nhóm 2	Chứng âm	Chứng dương
1	Dương tính 100% (10/10)	Dương tính 100% (10/10)	Âm tính	Dương tính

2	Dương tính 100% (10/10)	Dương tính 100% (10/10)	Âm tính	Dương tính
3	Dương tính 100% (10/10)	Dương tính 100% (10/10)	Âm tính	Dương tính
4	Dương tính 100% (10/10)	Dương tính 100% (10/10)	Âm tính	Dương tính
5	Dương tính 100% (10/10)	Dương tính 100% (10/10)	Âm tính	Dương tính
6	Dương tính 100% (10/10)	Dương tính 100% (10/10)	Âm tính	Dương tính

- Từ bảng trên cho thấy không có sự khác biệt giữa các nhóm thực hiện ở tất cả 6 lần tiến hành làm thâm định khác nhau.



Hình 14. Mẫu thử nhóm 1 trên môi trường DHL. Khuẩn lạc đặc trưng dạng S, có màu hồng phấn, nhày, kích thước 2-3mm.



Hình 15. Mẫu thử nhóm 2 trên môi trường DHL. Khuẩn lạc đặc trưng dạng S, có màu hồng phấn, nhày, kích thước 2-3mm.



Hình 16. Chứng dương trên môi trường MacConkey được nuôi cấy bởi nhóm 1



Hình 17. Chứng dương trên môi trường MacConkey được nuôi cấy bởi nhóm 2

4. Bàn luận

- Khi tiến hành nuôi cấy mẫu thử, chứng dương và chứng âm cho thấy khuẩn lạc của *Klebsiella oxytoca* mọc đặc trưng trên các môi trường được sử dụng trong quy trình và khác biệt so với chứng âm ở tất cả các lần thử nghiệm. Từ đó có thể thấy quy trình kiểm tra *Klebsiella oxytoca* trên chuột nhắt trắng bằng phương pháp nuôi cấy đảm bảo được tính đặc hiệu và chính xác khi thực hiện giám sát tại NICVB. So với quy trình tiêu chuẩn của Trung tâm động vật thí nghiệm thuộc trường đại học Mahidol, Thái Lan đã đạt chứng nhận AAALAC, quy trình tại NICVB đã được cải tiến bước định danh vi sinh vật từ dùng thanh định danh API20 gồm 20 phản ứng sinh hóa, đọc kết quả bằng mắt thường sang định danh bằng máy định danh BD phoenix sử dụng thanh định danh gồm 51 phản ứng và đọc kết quả tự động dựa trên kỹ thuật đo quang. Từ đó cho thấy kết quả định danh có độ chính xác và tin cậy cao hơn, đồng thời giúp giảm thời gian và thao tác khi thực hiện.

5. Kết luận

Quy trình kiểm tra *Klebsiella oxytoca* trên chuột nhắt trắng bằng phương pháp nuôi cấy đã được thẩm định với hai tiêu chí: Độ đặc hiệu và độ mạnh.

Tài liệu tham khảo

[1] William R. Shek and Diane J. Gaertner (2020). Microbiological Quality Control for Laboratory Rodents and Lagomorphs, Chapter 10.

[2] M Maehler (Convenor) (2014). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units.

[3] Andre Bleich (2008). *Klebsiella oxytoca*: opportunistic infections in laboratory rodents, *Laboratory Animals*, 42, 369–375.