

BỘ Y TẾ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Số: /QĐ-BYT

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

QUYẾT ĐỊNH

Về việc ban hành tài liệu chuyên môn
“Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

Căn cứ Luật Khám bệnh, chữa bệnh năm 2023;

Căn cứ Nghị định số 42/2025/NĐ-CP ngày 27/02/2025 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Y tế;

Căn cứ Thông tư số 23/2024/TT-BYT ngày 18 tháng 10 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành danh mục kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh;

Căn cứ Biên bản họp ngày 16 tháng 05 năm 2025 của Hội đồng chuyên môn nghiệm thu quy trình kỹ thuật về vi sinh và công văn số 4196/BM-KHTH ngày 03/07/2025 của Bệnh viện Bạch Mai gửi Cục QLKCB dự thảo quy trình kỹ thuật về Vi sinh đã được Chủ tịch Hội đồng nghiệm thu duyệt dự thảo;

Theo đề nghị của Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh,

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Ban hành kèm theo Quyết định này Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”, gồm 455 quy trình kỹ thuật.

Điều 2. Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1” được áp dụng tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh.

Điều 3. Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày ký, ban hành. Bãi bỏ quy trình kỹ thuật có số thứ tự từ 1 đến 18, từ 31 đến 32, từ 38-231 trong “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh Y học” được ban hành kèm theo Quyết định số 26/QĐ-BYT ngày 03/01/2013 và quy trình kỹ thuật có số thứ tự là 1, từ 3 đến 45, từ 47 đến 77 và 83 trong “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh” được ban hành kèm theo Quyết định số 6769/QĐ-BYT ngày 08/11/2018 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

Điều 4. Các ông, bà: Chánh Văn phòng Bộ, Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh, Cục trưởng, Vụ trưởng các Cục, Vụ thuộc Bộ Y tế; Giám đốc các bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế; Giám đốc Sở Y tế các tỉnh, thành phố trực thuộc trung ương; Thủ trưởng Y tế các ngành và các cơ quan, đơn vị liên quan chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

Nơi nhận:

- Như Điều 4;
- Bộ trưởng (để báo cáo);
- Các Thứ trưởng;
- BHXHVN - Bộ Tài chính;
- Cổng thông tin điện tử Bộ Y tế;
- Website Cục QLKCB;
- Lưu: VT, KCB.

KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG

Trần Văn Thuấn

ngocth.kcb_Truong Le Van Ngoc_04/09/2025 10:23:12



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ VI SINH - TẬP 1

(Ban hành kèm theo Quyết định số /QĐ-BYT
ngày tháng năm 2025 của Bộ trưởng Bộ Y tế)

Hà Nội, 2025

Chỉ đạo biên soạn, thẩm định

GS.TS. Trần Văn Thuận Thứ trưởng Bộ Y tế

TS. Hà Anh Đức Cục trưởng Cục QLKCB - Bộ Y tế

Chủ biên

PGS. TS. Đào Xuân Cơ Giám đốc Bệnh viện Bạch Mai

TS. Vương Ánh Dương Phó Cục trưởng Cục QLKCB

PGS. TS. Nguyễn Tuấn Tùng Phó Giám đốc Bệnh viện Bạch Mai

TS. Trương Thái Phương Trưởng khoa Vi sinh - Bệnh viện Bạch Mai

BSCCKII. Lê Thị Ngân Phó Trưởng khoa Vi sinh - Bệnh viện Bạch Mai

PGS.TS. Đoàn Mai Phương Giám đốc kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh – Hệ thống Vinmec, Nguyên Trưởng khoa Vi sinh - Bệnh viện Bạch Mai

Tham gia biên soạn, thẩm định

PGS.TS. Phạm Hồng Nhung Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Nguyễn Ngọc Diệp Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Phạm Thị Thảo Hương Bệnh viện Bạch Mai

TS. Nguyễn Thị Tuyết Mai Bệnh viện Bạch Mai

BSCCKII. Nguyễn Sâm Bệnh viện Bạch Mai

CN. Trần Minh Tuấn Bệnh viện Bạch Mai

TS. Nguyễn Văn An Bệnh viện Quân Y 103

ThS. Lê Hoài Cường Bệnh viện Chợ Rẫy

ThS. Lê Trung Dũng Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Nguyễn Mỹ Hạnh Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương

TS. Phạm Quỳnh Hoa Bệnh viện Da liễu Trung ương

TS. Lê Nguyễn Minh Hoa Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương

BSCCKII. Nguyễn Thị Lan Hương Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Vũ Thị Huyền Bệnh viện Nhi Trung ương

TS. Nguyễn Trọng Khoa Phó Cục trưởng Cục QLKCB

ThS. Nguyễn Tuấn Linh Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Lê Phương Mai Bệnh viện Chợ Rẫy

ThS. Đỗ Thị Lê Na Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương

TS. Hoàng Thị Bích Ngọc	Bệnh viện Nhi Trung ương
ThS. Trương Lê Văn Ngọc	Cục QLKCB – Bộ Y tế
TS. Trương Thiên Phú	Bệnh viện Chợ Rẫy
CKI.XN. Nguyễn Thị Nam Phương	Bệnh viện Chợ Rẫy
TS. Bùi Tiến Sỹ	Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
CKI.XN. Nguyễn Văn Thành	Bệnh viện Chợ Rẫy
ThS. Trịnh Hồ Tình	Bệnh viện Đa khoa Bình Định
BSCCKII. Lê Quốc Thịnh	Bệnh viện Nhi đồng 1
PGS.TS. Lê Viết Quỳnh Trâm	Bệnh viện Đại học Y Dược Huế
TS. Lê Khánh Trâm	Bệnh viện Bạch Mai
TS. Văn Đình Tráng	Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương
ThS. Nguyễn Thị Kiều Trinh	Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương
TS. Huỳnh Minh Tuấn	Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố HCM
TS. Mai Văn Tuấn	Bệnh viện Đa khoa Trung ương Huế
CKI.XN. Phan Thanh Tùng	Bệnh viện Chợ Rẫy
PGS.TS. Vũ Thị Tường Vân	Bệnh viện Bạch Mai
Thư ký	
BSCCKII. Lê Thị Ngân	Phó Trưởng khoa Vi sinh – Bệnh viện Bạch Mai
PGS.TS. Phạm Hồng Nhung	Phó Trưởng khoa Vi sinh – Bệnh viện Bạch Mai
ThS. Trương Lê Văn Ngọc	Cục QLKCB
ThS. Nguyễn Ngọc Điệp	Bệnh viện Bạch Mai
CN. Trần Minh Tuấn	Bệnh viện Bạch Mai
ThS. Bùi Thị Giang	Bệnh viện Bạch Mai
CN. Đỗ Thị Thư	Cục QLKCB
BS. Vũ Thanh Tùng	Bệnh viện E

LỜI NÓI ĐẦU

Bộ Y tế đã ban hành Tài liệu “Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh y học” vào các năm 2013 và 2018. Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật này làm căn cứ để các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh, người hành nghề khám bệnh, chữa bệnh, và nhân viên y tế triển khai áp dụng và thực hiện các kỹ thuật xét nghiệm vi sinh y học.

Nhằm mục đích cập nhật, bổ sung những tiến bộ khoa học kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh và tiếp tục chuẩn hóa quy trình thực hiện kỹ thuật trong xét nghiệm Vi sinh, Bộ Y tế đã giao một số bệnh viện làm đầu mối xây dựng và cập nhật Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh, bao gồm Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện Nhi Trung ương, Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương, Bệnh viện Da liễu Trung ương, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, Bệnh viện Quân Y 103, Bệnh viện Đại học Y dược Huế, Bệnh viện đa khoa tỉnh Bình Định, Bệnh viện Chợ Rẫy, Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh và Bệnh viện Nhi đồng 1. Trong đó Bệnh viện Bạch Mai được giao làm đầu mối tổng hợp chung. Các bệnh viện được giao nhiệm vụ đã huy động và phân công các phó giáo sư, tiến sĩ, bác sĩ... về vi sinh để biên soạn Hướng dẫn quy trình kỹ thuật; tổ chức họp hội đồng khoa học trong bệnh viện để góp ý, hoàn thiện dự thảo; thực hiện biên tập, hoàn thiện theo ý kiến của Hội đồng chuyên môn nghiệm thu do Bộ Y tế thành lập và chịu trách nhiệm về chuyên môn kỹ thuật quy định trong Hướng dẫn quy trình kỹ thuật. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật được các thành viên biên soạn rà soát hướng dẫn hiện có, tham khảo các tài liệu trong nước, nước ngoài để cập nhật.

Bộ Y tế đã thành lập Hội đồng chuyên môn nghiệm thu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh với sự tham gia của đại diện một số vụ, cục chức năng của Bộ Y tế, các chuyên gia hàng đầu về vi sinh. Các thành viên chuyên môn đã làm việc với tinh thần trách nhiệm, đóng góp về thời gian, trí tuệ, kinh nghiệm để góp ý, nghiệm thu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật. **Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1** được xây dựng cho các kỹ thuật có trong Phụ lục số 02 đồng thời có tên (trùng hoặc tên khác nhưng bản chất kỹ thuật và quy trình kỹ thuật thực hiện giống nhau) trong Phụ lục số 01 (của Thông tư số 23/2024/TT-BYT ngày 18 tháng 10 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành danh mục kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh), đã được Hội đồng chuyên môn nghiệm thu và được Bộ Y tế ban hành với **tổng số 455 quy trình kỹ thuật**. Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật này thay thế các quy trình kỹ thuật từ có số thứ tự từ 1 đến 18, từ 31 đến 32, từ 38-231 trong “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh Y học” được ban hành kèm theo Quyết định số 26/QĐ-BYT ngày 03/01/2013 và quy trình kỹ thuật có số thứ tự là 1, từ 3 đến 45, từ 47 đến 77 và 83 trong “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh” được ban hành kèm theo Quyết định số 6769/QĐ-BYT ngày 08/11/2018.

Bộ Y tế xin trân trọng cảm ơn sự đóng góp tích cực và hiệu quả của các chuyên gia về Vi sinh, đặc biệt là tập thể lãnh đạo và nhóm thư ký biên soạn và nghiệm thu của Bệnh viện Bạch Mai (khoa Vi sinh).

Trong quá trình biên tập khó tránh được những sai sót, chúng tôi rất mong nhận được sự đóng góp ý kiến từ quý độc giả đồng nghiệp để Tài liệu chuyên môn ngày một hoàn thiện hơn. Mọi ý kiến góp ý xin gửi về Cục Quản lý Khám, chữa bệnh - Bộ Y Tế, 138A Giảng Võ, phường Giảng Võ, Hà Nội. Xin trân trọng cảm ơn!

GS.TS. Trần Văn Thuận

Thư trưởng Bộ Y tế

NGUYÊN TẮC ÁP DỤNG HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT

1. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật được xây dựng và ban hành theo từng chương, chuyên ngành. Hướng dẫn bao gồm các quy định về chỉ định, chống chỉ định, thận trọng, chuẩn bị thực hiện kỹ thuật, đến các bước thực hiện theo trình tự từ khi bắt đầu đến khi kết thúc thực hiện kỹ thuật.
2. Tài liệu chuyên môn Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh được xây dựng và ban hành cho các kỹ thuật có trong Phụ lục số 02 Thông tư số 23/2024/TT-BYT đồng thời có tên (trùng hoặc tên khác nhưng bản chất kỹ thuật và quy trình kỹ thuật thực hiện giống nhau) trong Phụ lục số 01 Thông tư số 23/2024/TT-BYT. Quy trình kỹ thuật của kỹ thuật có tên trong cột số 3 được áp dụng đối với các kỹ thuật có tên trong cột số 5 của Phụ lục về Danh mục kỹ thuật về Vi sinh được ban hành kèm theo Quyết định này.
3. Quy định về thời gian thực hiện kỹ thuật, nhân lực (chức danh chuyên môn nghề nghiệp, số lượng nhân lực), thuốc, thiết bị y tế... trong Hướng dẫn quy trình kỹ thuật do Bộ Y tế ban hành dựa trên tính phổ biến, thường quy thực hiện tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh. Trong thực tế triển khai, căn cứ diễn biến lâm sàng, tình trạng người bệnh, điều kiện thực tế của cơ sở khám bệnh, chữa bệnh, việc triển khai kỹ thuật có thể cần huy động thêm nhân lực chuyên môn, bổ sung thuốc, thiết bị y tế..., tăng thời gian thực hiện kỹ thuật...
4. Chỉ sử dụng các thuốc, thiết bị y tế... được cấp phép theo quy định hiện hành.
5. Trong quá trình triển khai áp dụng Hướng dẫn quy trình kỹ thuật, nếu thấy các bất cập hoặc nhu cầu cần sửa đổi, bổ sung, các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh chủ động cập nhật và ban hành Hướng dẫn quy trình kỹ thuật, đồng thời báo cáo, đề xuất Bộ Y tế (Cục QLKCB) về việc cập nhật để ban hành áp dụng trong cả nước.

MỤC LỤC

LỜI NÓI ĐẦU

NGUYÊN TẮC ÁP DỤNG HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT

PHỤ LỤC DANH MỤC KỸ THUẬT

DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

1. Vi khuẩn nhuộm soi.....	1
2. AFB trực tiếp nhuộm Ziehl-Neelsen	5
3. <i>Mycobacterium leprae</i> nhuộm soi	9
4. <i>Mycobacterium leprae</i> mảnh sinh thiết	13
5. <i>Vibrio cholerae</i> nhuộm soi	16
6. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> nhuộm soi.....	19
7. <i>Neisseria meningitidis</i> nhuộm soi.....	22
8. <i>Treponema pallidum</i> nhuộm soi	26
9. Vi hệ đường ruột	30
10. <i>Plasmodium</i> (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định tính	34
11. <i>Plasmodium</i> (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định lượng	38
12. <i>Plasmodium</i> (Ký sinh trùng sốt rét) Ag test nhanh	42
13. Vi khuẩn test nhanh	46
14. <i>Streptococcus pneumoniae</i> Ag test nhanh.....	50
15. <i>Clostridium difficile</i> độc tố A và B test nhanh	54
16. <i>Legionella pneumophila</i> Ag test nhanh.....	61
17. <i>Rickettsia</i> Ab test nhanh	65
18. <i>Salmonella</i> Ag test nhanh	69
19. <i>Salmonella</i> Ab test nhanh	73
20. <i>Treponema pallidum</i> test nhanh	77
21. Virus test nhanh	81
22. Chikungunya test nhanh	85
23. Adenovirus test nhanh	89
24. RSV test nhanh	93
25. <i>Cryptosporidium</i> test nhanh.....	97
26. Vi nấm test nhanh	101
27. <i>Aspergillus</i> Ag test nhanh	105
28. <i>Aspergillus</i> Ab test nhanh.....	109

29. <i>Entamoeba histolytica</i> test nhanh	114
30. <i>Giardia lamblia</i> test nhanh	118
31. Ký sinh trùng test nhanh	122
32. Vi khuẩn nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường	126
33. Vi nấm nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường	131
34. Vi khuẩn nuôi cấy và định danh hệ thống tự động	136
35. Vi nấm nuôi cấy, định danh hệ thống tự động	141
36. Vi khuẩn kháng thuốc định tính	146
37. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> kháng thuốc định tính	151
38. <i>Neisseria meningitidis</i> kháng thuốc	156
39. Vi nấm kháng thuốc định tính	162
40. Vi khuẩn kháng thuốc hệ thống tự động	167
41. Vi khuẩn kháng thuốc nhóm Carbapenemase trên máy tự động	171
42. Vi nấm kháng thuốc hệ thống tự động	175
43. Virus Ag miễn dịch bán tự động	179
44. Virus Ag miễn dịch tự động	184
45. Dengue virus NS1Ag miễn dịch tự động	189
46. Adenovirus miễn dịch tự động	195
47. Rotavirus Ag miễn dịch tự động	200
48. Virus Ab miễn dịch bán tự động	205
49. Zika virus IgM miễn dịch bán tự động	210
50. Zika virus IgG miễn dịch bán tự động	216
51. Mump Virus IgM miễn dịch bán tự động	221
52. Mump Virus IgG miễn dịch bán tự động	227
53. Chikungunia virus IgM miễn dịch bán tự động	233
54. Chikungunia virus IgG miễn dịch bán tự động	239
55. SARS-CoV-2 IgG miễn dịch bán tự động	245
56. SARS-CoV-2 IgM miễn dịch bán tự động	251
57. Influenza IgG miễn dịch bán tự động	257
58. Influenza IgA miễn dịch bán tự động	262
59. VZV IgM miễn dịch bán tự động	267
60. VZV IgG miễn dịch bán tự động	273
61. Parvovirus B19 IgM miễn dịch bán tự động	279

62. Parvovirus B19 IgG miễn dịch bán tự động.....	284
63. Virus Ab miễn dịch tự động	289
64. Zika virus IgM miễn dịch tự động	294
65. Zika virus IgG miễn dịch tự động.....	300
66. Parvo virus B19 IgM miễn dịch tự động	307
67. Parvo virus B19 IgG miễn dịch tự động.....	313
68. Mumps virus IgM miễn dịch tự động.....	319
69. Mumps virus IgG miễn dịch tự động	324
70. Chikungunia virus IgM miễn dịch tự động	329
71. Chikungunia virus IgG miễn dịch tự động.....	336
72. SARS-CoV-2 IgG miễn dịch tự động	343
73. SARS-CoV-2 IgM miễn dịch tự động.....	350
74. SARS-CoV-2 Ab total miễn dịch tự động.....	356
75. Dengue virus IgM miễn dịch tự động.....	361
76. Dengue virus IgG miễn dịch tự động	367
77. EBV EA-D IgG miễn dịch tự động	373
78. EBV EB-NA IgG miễn dịch tự động	379
79. Influenza virus IgA miễn dịch tự động.....	384
80. Influenza virus IgG miễn dịch tự động.....	389
81. SARS-CoV-2 S Ab miễn dịch tự động.....	394
82. <i>Streptococcus pyogenes</i> ASO miễn dịch tự động	400
83. <i>Bordetella pertussis</i> IgG miễn dịch tự động	405
84. <i>Bordetella pertussis</i> IgM miễn dịch tự động.....	410
85. <i>Chlamydia trachomatis</i> IgG miễn dịch tự động.....	415
86. <i>Chlamydia trachomatis</i> IgM miễn dịch tự động	420
87. <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgG miễn dịch tự động	425
88. <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgM miễn dịch tự động.....	430
89. <i>Chlamydia trachomatis</i> IgA miễn dịch tự động.....	435
90. <i>Leptospira</i> IgG miễn dịch tự động	440
91. <i>Leptospira</i> IgM miễn dịch tự động.....	447
92. <i>Rickettsia tsutsugamushi</i> miễn dịch tự động	454
93. <i>Treponema pallidum</i> RPR định lượng hệ thống tự động	461
94. Vi khuẩn Ag miễn dịch bán tự động	467

95. <i>Helicobacter pylori</i> Ag miễn dịch bán tự động.....	472
96. Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động	478
97. <i>Bordetella pertussis</i> IgG miễn dịch bán tự động.....	483
98. <i>Bordetella pertussis</i> IgM miễn dịch bán tự động.....	488
99. <i>Chlamydia trachomatis</i> IgG miễn dịch bán tự động.....	493
100. <i>Chlamydia trachomatis</i> IgM miễn dịch bán tự động	499
101. <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgG miễn dịch bán tự động	505
102. <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgM miễn dịch bán tự động.....	510
103. <i>Helicobacter pylori</i> Ab miễn dịch tự động	515
104. <i>Leptospira</i> IgG miễn dịch bán tự động	522
105. <i>Leptospira</i> IgM miễn dịch bán tự động	528
106. <i>Legionella pneumophila</i> IgG miễn dịch bán tự động	534
107. <i>Legionella pneumophila</i> IgM miễn dịch bán tự động.....	538
108. <i>Rickettsia tsutsugamushi</i> miễn dịch bán tự động	544
109. Vi khuẩn Ag miễn dịch tự động	550
110. <i>Helicobacter pylori</i> Ag miễn dịch tự động	557
111. <i>Campylobacter</i> Ag miễn dịch tự động	564
112. Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động	569
113. Vi nấm Ag miễn dịch bán tự động	575
114. <i>Aspergillus</i> Ag miễn dịch bán tự động.....	580
115. <i>Aspergillus galactomannan</i> định lượng	585
116. Vi nấm Ab miễn dịch bán tự động	590
117. <i>Aspergillus</i> Ab miễn dịch bán tự động.....	595
118. <i>Aspergillus fumigatus</i> IgG miễn dịch bán tự động.....	600
119. <i>Aspergillus fumigatus</i> IgM miễn dịch bán tự động.....	605
120. Vi nấm Ag miễn dịch tự động	610
121. <i>Aspergillus</i> Ag miễn dịch tự động.....	616
122. Vi nấm Ab miễn dịch tự động	622
123. Vi khuẩn kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)	628
124. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> kháng thuốc định lượng (MIC)	634
125. Vi nấm kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)	639
126. Vi khuẩn kháng sinh phối hợp.....	645
127. Vi khuẩn kỵ khí nuôi cấy và định danh.....	650

128. <i>Helicobacter pylori</i> nuôi cấy, định danh	655
129. Vi khuẩn vi hiếu khí nuôi cấy và định danh.....	660
130. <i>Clostridium</i> nuôi cấy, định danh	665
131. Vi khuẩn kháng định.....	670
132. Vi khuẩn định danh PCR	675
133. Vi khuẩn định danh real-time PCR	681
134. Vi khuẩn real-time PCR.....	687
135. <i>Leptospira</i> Real-time PCR.....	693
136. <i>Rickettsia</i> Real-time PCR	700
137. <i>Hantavirus</i> Real-time PCR.....	707
138. <i>Mycoplasma genitalium</i> Real-time PCR	713
139. MTB-NTM (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Non tuberculous mycobacteria) Real-time PCR	720
140. <i>Candida</i> Real-time PCR	727
141. Vi nấm Real-time PCR	733
142. <i>Pneumocystis jirovecii</i> Real-time PCR	739
143. <i>Aspergillus</i> Real-time PCR.....	745
144. <i>Pneumocystis carinii</i> Real-time PCR.....	751
145. Virus Real-time PCR	757
146. Zika virus Real-time PCR.....	762
147. <i>Parvo virus B19</i> đo tải lượng Real-time PCR.....	768
148. HDV Real - time PCR	774
149. HEV Real - time PCR.....	779
150. Mumps Virus Real-time PCR.....	784
151. Chikungunia virus Real-time PCR	790
152. Vi khuẩn định danh giải trình tự gen.....	795
153. Vi khuẩn kháng thuốc giải trình tự gen.....	802
154. <i>Vibrio cholerae</i> giải trình tự gen	809
155. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> kháng thuốc giải trình tự gen.....	816
156. <i>Chlamydia</i> giải trình tự gen	823
157. <i>Helicobacter pylori</i> giải trình tự gen	830
158. Virus giải trình tự gene	837
159. HBV genotype giải trình tự gene.....	845

160. HBV kháng thuốc giải trình tự gene.....	852
161. Virus kháng thuốc giải trình tự gene	860
162. HCV genotype giải trình tự gene.....	868
163. HIV kháng thuốc giải trình tự gene	876
164. HIV genotype giải trình tự gene	884
165. EV71 genotype giải trình tự gene.....	892
166. Enterovirus genotype giải trình tự gene	898
167. HPV genotype giải trình tự gene	905
168. <i>Influenza virus A, B</i> giải trình tự gene.....	913
169. Rubella virus giải trình tự gene	919
170. Ký sinh trùng xác định trình tự một đoạn gen.....	927
171. Vi khuẩn kháng thuốc PCR	934
172. Vi khuẩn kháng thuốc real-time PCR.....	940
173. Carbapenemase test nhanh.....	946
174. Enzym MCR kháng Colistin test nhanh	950
175. ESBLs test nhanh.....	954
176. Vi sinh vật nhiễm khuẩn huyết Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	958
177. Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	964
178. Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường ruột Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	970
179. Vi sinh vật nhiễm khuẩn não - màng não Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	976
180. AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang	982
181. HIV đo tải lượng - Xpert	986
182. HCV Xpert.....	990
183. MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) PCR hệ thống tự động.....	998
184. MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) Real-time PCR	1005
185. NTM (<i>Nontuberculous mycobacteria</i>) định danh Real-time PCR	1011
186. Đơn bào đường ruột nhuộm soi.....	1018
187. Trứng giun soi tập trung	1022
188. <i>Filaria</i> (Giun chỉ) ấu trùng trong máu nhuộm soi.....	1026
189. <i>Demodex</i> nhuộm soi.....	1030

190. <i>Phthirus pubis</i> (Rận mu) nhuộm soi.....	1034
191. <i>Sarcoptes scabies hominis</i> (ghẻ) soi tươi	1038
192. <i>Cysticercus cellulosae</i> (Sán lợn) ấu trùng soi mảnh sinh thiết	1042
193. <i>Gnathostoma</i> ấu trùng soi mảnh sinh thiết.....	1046
194. <i>Pneumocystis jirovecii</i> nhuộm soi	1050
195. <i>Taenia</i> (Sán dây) soi tươi định danh	1054
196. <i>Toxocara</i> (Giun đũa chó, mèo) soi mảnh sinh thiết	1058
197. <i>Trichinella spiralis</i> (Giun xoắn) soi mảnh sinh thiết	1062
198. <i>Trichomonas vaginalis</i> nhuộm soi	1066
199. Xét nghiệm soi đờm tìm trứng sán lá phổi	1070
200. Vi nấm nhuộm soi.....	1074
201. <i>Vibrio cholerae</i> soi tươi	1078
202. <i>Treponema pallidum</i> soi tươi.....	1081
203. Hồng cầu, bạch cầu trong phân soi tươi	1085
204. Đơn bào đường ruột soi tươi.....	1089
205. Trứng giun, sán soi tươi.....	1093
206. <i>Strongyloides stercoralis</i> (Giun lươn) ấu trùng soi tươi	1097
207. <i>Demodex</i> soi tươi	1100
208. <i>Phthirus pubis</i> (Rận mu) soi tươi	1104
209. <i>Sarcoptes scabies hominis</i> (Ghẻ) soi tươi	1107
210. <i>Trichomonas vaginalis</i> soi tươi	1111
211. Vi nấm soi tươi	1115
212. <i>Vibrio cholerae</i> PCR.....	1119
213. <i>Vibrio cholerae</i> Real-time PCR.....	1125
214. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> PCR.....	1131
215. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Real-time PCR.....	1137
216. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Real-time PCR hệ thống tự động	1144
217. <i>Chlamydia</i> Real-time PCR hệ thống tự động.....	1150
218. <i>Neisseria meningitidis</i> PCR.....	1157
219. <i>Neisseria meningitidis</i> Real-time PCR.....	1163
220. <i>Chlamydia</i> test nhanh	1169
221. <i>Chlamydia</i> Ab miễn dịch bán tự động.....	1173
222. <i>Chlamydia</i> Ab miễn dịch tự động	1179

223. <i>Chlamydia</i> PCR	1184
224. <i>Chlamydia</i> Real-time PCR	1190
225. <i>Clostridium difficile</i> miễn dịch bán tự động.....	1196
226. <i>Clostridium difficile</i> độc tố A và B miễn dịch tự động.....	1202
227. <i>Clostridium difficile</i> độc tố A và B miễn dịch tự động.....	1208
228. <i>Clostridium difficile</i> GDH miễn dịch tự động.....	1213
229. <i>Clostridium difficile</i> PCR	1218
230. <i>Helicobacter pylori</i> Ag test nhanh	1224
231. <i>Helicobacter pylori</i> Ab test nhanh	1228
232. <i>Helicobacter pylori</i> miễn dịch bán tự động	1232
233. <i>Helicobacter pylori</i> Real-time PCR	1237
234. <i>Leptospira</i> test nhanh.....	1243
235. <i>Leptospira</i> PCR.....	1247
236. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> IgG miễn dịch bán tự động	1253
237. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> IgM miễn dịch bán tự động.....	1257
238. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> IgG miễn dịch tự động	1262
239. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> IgM miễn dịch tự động.....	1268
240. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Real-time PCR.....	1273
241. <i>Mycoplasma hominis</i> Real-time PCR	1279
242. <i>Rickettsia</i> Ab miễn dịch bán tự động	1285
243. <i>Rickettsia</i> Ab miễn dịch tự động	1290
244. SARS-CoV-2 Ag miễn dịch tự động.....	1297
245. <i>Salmonella</i> Widal.....	1303
246. <i>Streptococcus pyogenes</i> ASO.....	1309
247. <i>Treponema pallidum</i> RPR định tính.....	1314
248. <i>Treponema pallidum</i> RPR định lượng	1319
249. <i>Treponema pallidum</i> TPHA định tính.....	1323
250. <i>Treponema pallidum</i> TPHA định lượng.....	1329
251. <i>Treponema pallidum</i> miễn dịch tự động	1335
252. <i>Treponema pallidum</i> Real-time PCR.....	1341
253. <i>Ureplasma urelyticum</i> Real-time PCR	1347
254. CMV đo tải lượng Real-time PCR	1353
255. EBV đo tải lượng Real-time PCR	1359

256. BK virus đo tải lượng Real-time PCR.....	1366
257. JC Virus đo tải lượng Real-time PCR	1373
258. SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.....	1379
259. SARS-CoV-2 Ag test nhanh.....	1386
260. HBsAg test nhanh	1390
261. HBsAb test nhanh	1394
262. HBcAb test nhanh	1398
263. HBsAg miễn dịch bán tự động	1402
264. HBsAb miễn dịch bán tự động	1407
265. HBsAg miễn dịch tự động	1411
266. HBsAg kháng định.....	1416
267. HBsAg định lượng.....	1422
268. HBsAb miễn dịch tự động	1427
269. HBsAb định lượng.....	1432
270. HBc IgM miễn dịch bán tự động.....	1437
271. HBc total miễn dịch bán tự động.....	1442
272. HBc IgM miễn dịch tự động.....	1447
273. HBc total miễn dịch tự động.....	1452
274. HBcrAg miễn dịch tự động.....	1457
275. HBeAg test nhanh.....	1462
276. HBeAb test nhanh.....	1466
277. HBeAg miễn dịch bán tự động.....	1470
278. HBeAb miễn dịch bán tự động.....	1475
279. HBeAg miễn dịch tự động.....	1480
280. HBeAb miễn dịch tự động.....	1485
281. HBV đo tải lượng Real-time PCR.....	1490
282. HBV đo tải lượng hệ thống tự động	1497
283. HBV genotype Real-time PCR.....	1505
284. HCV genotype Real-time PCR.....	1511
285. HPV genotype Real-time PCR	1518
286. Virus genotype Real-time PCR (cho một loại Vi sinh vật)	1525
287. HBV kháng thuốc Real-time PCR (cho 1 loại thuốc).....	1531
288. HCV Ab test nhanh.....	1537

289. HCV Ab miễn dịch bán tự động.....	1541
290. HCV Ag/Ab miễn dịch bán tự động.....	1546
291. HCV Ab miễn dịch tự động.....	1551
292. HCV Ag/Ab miễn dịch tự động.....	1556
293. HCV Core Ag miễn dịch tự động.....	1561
294. HCV PCR.....	1566
295. EBV PCR.....	1573
296. Rotavirus PCR	1579
297. HCV đo tải lượng Real-time PCR.....	1586
298. HCV đo tải lượng hệ thống tự động.....	1592
299. HAV Ab test nhanh.....	1598
300. HAV IgM miễn dịch bán tự động.....	1602
301. HAV total miễn dịch bán tự động	1607
302. HAV IgM miễn dịch tự động	1612
303. HAV total miễn dịch tự động	1617
304. HDV Ag miễn dịch bán tự động.....	1622
305. HDV IgM miễn dịch bán tự động.....	1627
306. HDV Ab miễn dịch bán tự động.....	1632
307. HEV Ab test nhanh	1636
308. HEV IgM test nhanh.....	1640
309. HEV IgM miễn dịch bán tự động.....	1644
310. HEV IgG miễn dịch bán tự động.....	1649
311. HEV IgM miễn dịch tự động.....	1654
312. HEV IgG miễn dịch tự động.....	1659
313. HIV Ab test nhanh	1664
314. HIV Ag/Ab test nhanh	1668
315. HIV Ab miễn dịch bán tự động	1672
316. HIV Ag/Ab miễn dịch bán tự động	1678
317. HIV Ab miễn dịch tự động.....	1683
318. HIV Ag/Ab miễn dịch tự động.....	1690
319. HIV khẳng định.....	1695
320. HIV DNA PCR	1701
321. HIV DNA Real-time PCR	1707

322. HIV đo tải lượng Real-time PCR	1713
323. HIV đo tải lượng hệ thống tự động	1719
324. Dengue Virus NS1Ag test nhanh	1725
325. Dengue virus IgA test nhanh	1729
326. Dengue virus IgM/IgG test nhanh	1733
327. Dengue virus NS1Ag/IgM/IgG test nhanh.....	1737
328. Dengue virus NS1Ag miễn dịch bán tự động	1741
329. Dengue virus IgM miễn dịch bán tự động.....	1746
330. Dengue virus IgG miễn dịch bán tự động	1751
331. Dengue virus PCR	1756
332. Dengue virus Real-time PCR	1762
333. Dengue virus serotype PCR.....	1766
334. CMV IgM miễn dịch bán tự động	1773
335. CMV IgG miễn dịch bán tự động.....	1778
336. CMV IgM miễn dịch tự động	1783
337. CMV IgG miễn dịch tự động.....	1788
338. CMV đo tải lượng hệ thống tự động	1793
339. CMV Avidity	1799
340. Rubella virus Avidity.....	1804
341. <i>Toxoplasma</i> Avidity.....	1809
342. HSV 1+2 IgM miễn dịch bán tự động.....	1814
343. HSV 1+2 IgG miễn dịch bán tự động.....	1819
344. HSV 1 IgG miễn dịch tự động.....	1824
345. HSV 2 IgG miễn dịch tự động.....	1829
346. HSV 1 + 2 IgM miễn dịch tự động.....	1834
347. HSV 1 + 2 IgG miễn dịch tự động	1840
348. HSV Real-time PCR	1846
349. HSV đo tải lượng hệ thống tự động.....	1852
350. EBV đo tải lượng hệ thống tự động.....	1856
351. VZV Real-time PCR.....	1861
352. EBV-VCA IgM miễn dịch bán tự động	1866
353. EBV-VCA IgG miễn dịch bán tự động	1871
354. EBV EA-D IgG miễn dịch bán tự động	1876

355. EBV EB-NA IgG miễn dịch bán tự động.....	1881
356. EBV-VCA IgM miễn dịch tự động	1886
357. EBV-VCA IgG miễn dịch tự động.....	1892
358. EV71 IgM/IgG test nhanh	1898
359. EV71 PCR.....	1902
360. EV71 Real - time PCR.....	1908
361. Enterovirus PCR	1913
362. Enterovirus Real-time PCR	1919
363. Adenovirus Real-time PCR	1923
364. Coronavirus PCR	1929
365. Coronavirus Real-time PCR	1935
366. Hantavirus test nhanh	1941
367. Hantavirus PCR	1945
368. HPV PCR	1951
369. HPV Real-time PCR	1957
370. HPV genotype Real-time PCR hệ thống tự động.....	1963
371. HPV genotype PCR hệ thống tự động.....	1969
372. Influenza virus A, B test nhanh	1974
373. Influenza virus A, B Real-time PCR	1978
374. JEV IgM miễn dịch bán tự động	1984
375. Measles Virus IgG miễn dịch bán tự động.....	1989
376. Measles Virus IgM miễn dịch bán tự động	1995
377. Measles IgG miễn dịch tự động.....	2001
378. Measles IgM miễn dịch tự động.....	2007
379. Measles virus Real-time PCR.....	2013
380. Norovirus test nhanh.....	2019
381. Rotavirus test nhanh.....	2023
382. Rotavirus Ag miễn dịch bán tự động.....	2027
383. RSV Ab miễn dịch bán tự động.....	2033
384. RSV Real-time PCR	2038
385. Rubella virus Ab test nhanh.....	2044
386. Rubella virus IgM miễn dịch bán tự động.....	2048
387. Rubella virus IgG miễn dịch bán tự động	2053

388. Rubella virus IgM miễn dịch tự động.....	2058
389. Rubella virus IgG miễn dịch tự động	2063
390. Rubella virus PCR	2068
391. Rubella virus Real-time PCR	2073
392. VZV IgM miễn dịch tự động.....	2081
393. VZV IgG miễn dịch tự động.....	2086
394. Hồng cầu trong phân test nhanh	2091
395. <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Giun tròn chuột) Ab miễn dịch bán tự động	2094
396. <i>Clonorchis/Opisthorchis</i> (Sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch bán tự động.....	2098
397. <i>Cysticercus cellulosae</i> (Sán lợn) Ab miễn dịch bán tự động	2102
398. <i>Echinococcus granulosus</i> (Sán dây chó) Ab miễn dịch bán tự động	2106
399. <i>Entamoeba histolytica</i> (Amip) Ab miễn dịch bán tự động	2110
400. <i>Fasciola</i> (Sán lá gan lớn) Ab miễn dịch bán tự động	2114
401. <i>Gnathostoma</i> (Giun đầu gai) Ab miễn dịch bán tự động.....	2118
402. <i>Paragonimus</i> (Sán lá phổi) Ab miễn dịch bán tự động.....	2122
403. <i>Schistosoma</i> (Sán máng) Ab miễn dịch bán tự động	2126
404. <i>Strongyloides stercoralis</i> (Giun lươn) Ab miễn dịch bán tự động	2130
405. <i>Toxocara</i> (Giun đũa chó, mèo) Ab miễn dịch bán tự động	2134
406. <i>Trichinella spiralis</i> (Giun xoắn) Ab miễn dịch bán tự động	2138
407. Ký sinh trùng Ag miễn dịch bán tự động	2142
408. <i>Taenia solium</i> (Sán dây lợn) Ab miễn dịch bán tự động	2148
409. Ký sinh trùng Ab miễn dịch bán tự động	2152
410. <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (giun tròn chuột) Ab miễn dịch tự động	2157
411. <i>Clonorchis/opisthorchis</i> (sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch tự động	2163
412. <i>Cysticercus cellulosae</i> (sán lợn) Ab miễn dịch tự động	2169
413. <i>Echinococcus granulosus</i> (sán dây chó) Ab miễn dịch tự động.....	2175
414. <i>Entamoeba histolytica</i> (amip) Ab miễn dịch tự động	2181
415. <i>Fasciola</i> (sán lá gan lớn) Ab miễn dịch tự động.....	2187
416. <i>Gnathostoma</i> (giun đầu gai) Ab miễn dịch tự động.....	2193
417. <i>Paragonimus</i> (sán lá phổi) Ab miễn dịch tự động	2199
418. <i>Schistosoma</i> (sán máng) Ab miễn dịch tự động.....	2205
419. <i>Strongyloides stercoralis</i> (giun lươn) Ab miễn dịch tự động	2211
420. <i>Toxocara</i> (giun đũa chó, mèo) Ab miễn dịch tự động	2217

421. <i>Trichinella spiralis</i> (giun xoắn) Ab miễn dịch tự động	2223
422. Ký sinh trùng Ag miễn dịch tự động	2229
423. <i>Taenia solium</i> (sán lợn) Ab miễn dịch tự động	2235
424. Ký sinh trùng Ab miễn dịch tự động	2241
425. <i>Plasmodium</i> Real-time PCR	2247
426. <i>Trichomonas vaginalis</i> Real-time PCR	2253
427. Ký sinh trùng Real-time PCR	2259
428. <i>Toxoplasma gondii</i> Real-time PCR	2264
429. <i>Toxoplasma</i> IgM miễn dịch bán tự động	2270
430. <i>Toxoplasma</i> IgG miễn dịch bán tự động	2276
431. <i>Toxoplasma</i> IgM miễn dịch tự động	2282
432. <i>Toxoplasma</i> IgG miễn dịch tự động	2287
433. <i>Cryptococcus</i> test nhanh	2292
434. Vi sinh vật cấy kiểm tra không khí	2296
435. Vi sinh vật cấy kiểm tra bàn tay	2301
436. Vi sinh vật cấy kiểm tra dụng cụ đã tiệt trùng	2305
437. Vi sinh vật cấy kiểm tra bề mặt	2310
438. Vi sinh vật cấy kiểm tra nước sinh hoạt	2314
439. Vi sinh vật cấy kiểm tra nước thải	2319
440. Vi khuẩn kháng thuốc - Phát hiện người mang	2324
441. Vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện - Phát hiện nguồn nhiễm	2329
442. Vi sinh vật định danh PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)	2334
443. Vi sinh vật nhiễm khuẩn huyết PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	2339
444. Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp trên PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	2344
445. Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp dưới PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	2349
446. Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường tiêu hóa PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	2354
447. Vi sinh vật nhiễm khuẩn não-màng não PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	2359
448. Vi sinh vật nhiễm khuẩn khớp PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	2364

449. <i>Mycoplasma hominis</i> nuôi cấy, định danh.....	2369
450. <i>Ureaplasma urealyticum</i> nuôi cấy, định danh.....	2373
451. <i>Mycoplasma hominis</i> kháng thuốc	2378
452. <i>Ureaplasma urealyticum</i> kháng thuốc	2382
453. <i>Mycoplasma hominis</i> & <i>Ureaplasma spp.</i> nuôi cấy định danh, kháng sinh đồ.....	2386
454. <i>Candida</i> Ag miễn dịch bán tự động	2391
455. Xác định gen Virus cúm A bằng kỹ thuật RT-PCR.....	2396

PHỤ LỤC

DANH MỤC KỸ THUẬT

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
1	1	Vi khuẩn nhuộm soi	24.1	Vi khuẩn nhuộm soi
2	2	AFB trực tiếp nhuộm Ziehl-Neelsen	24.17	AFB trực tiếp nhuộm Ziehl-Neelsen
3	3	Mycobacterium leprae nhuộm soi	24.39	Mycobacterium leprae nhuộm soi
4	4	Mycobacterium leprae mảnh sinh thiết	24.41	Mycobacterium leprae mảnh sinh thiết
5	5	Vibrio cholerae nhuộm soi	24.43	Vibrio cholerae nhuộm soi
6	6	Neisseria gonorrhoeae nhuộm soi	24.49	Neisseria gonorrhoeae nhuộm soi
7	7	Neisseria meningitidis nhuộm soi	24.56	Neisseria meningitidis nhuộm soi
8	8	Treponema pallidum nhuộm soi	24.96	Treponema pallidum nhuộm soi
9	9	Vi hệ đường ruột	24.16	Vi hệ đường ruột
10	10	Plasmodium (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định tính	24.289	Plasmodium (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định tính
11	11	Plasmodium (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định lượng	24.290	Plasmodium (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định lượng
12	12	Plasmodium (Ký sinh trùng sốt rét) Ag test nhanh	24.291	Plasmodium (Ký sinh trùng sốt rét) Ag test nhanh
13	13	Vi khuẩn test nhanh	24.2	Vi khuẩn test nhanh
14	130	Streptococcus pneumoniae Ag test nhanh	24.2	Vi khuẩn test nhanh

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
15	195	Clostridium difficile độc tố A và B test nhanh	24.2	Vi khuẩn test nhanh
16	212	Legionella pneumophila Ag test nhanh	24.2	Vi khuẩn test nhanh
17	228	Rickettsia Ab test nhanh	24.2	Vi khuẩn test nhanh
18	236	Salmonella Ag test nhanh	24.2	Vi khuẩn test nhanh
19	237	Salmonella Ab test nhanh	24.2	Vi khuẩn test nhanh
20	14	Treponema pallidum test nhanh	24.98	Treponema pallidum test nhanh
21	16	Virus test nhanh	24.108	Virus test nhanh
22	269	Chikungunia test nhanh	24.108	Virus test nhanh
23	396	Adenovirus test nhanh	24.108	Virus test nhanh
24	426	RSV test nhanh	24.108	Virus test nhanh
25	17	Cryptosporidium test nhanh	24.270	Cryptosporidium test nhanh
26	18	Vi nấm test nhanh	24.320	Vi nấm test nhanh
27	480	Aspergillus Ag test nhanh	24.320	Vi nấm test nhanh
28	525	Aspergillus Ab test nhanh	24.320	Vi nấm test nhanh
29	19	Entamoeba histolytica test nhanh	24.356	Ký sinh trùng test nhanh
30	20	Giardia lamblia test nhanh	24.356	Ký sinh trùng test nhanh
31	21	Ký sinh trùng test nhanh	24.356	Ký sinh trùng test nhanh
32	22	Vi khuẩn nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường	24.3	Vi khuẩn nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
33	23	Vi nấm nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường	24.322	Vi nấm nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường
34	24	Vi khuẩn nuôi cấy và định danh hệ thống tự động	24.4	Vi khuẩn nuôi cấy và định danh hệ thống tự động
35	25	Vi nấm nuôi cấy, định danh hệ thống tự động	24.323	Vi nấm nuôi cấy và định danh hệ thống tự động
36	26	Vi khuẩn kháng thuốc định tính	24.6	Vi khuẩn kháng thuốc định tính
37	27	Neisseria gonorrhoeae kháng thuốc định tính	24.6	Vi khuẩn kháng thuốc định tính
38	28	Neisseria meningitidis kháng thuốc	24.6	Vi khuẩn kháng thuốc định tính
39	29	Vi nấm kháng thuốc định tính	24.6	Vi nấm kháng thuốc định tính
40	30	Vi khuẩn kháng thuốc hệ thống tự động	24.7	Vi khuẩn kháng thuốc hệ thống tự động
41	58	Vi khuẩn kháng thuốc nhóm Carbapenemase trên máy tự động	24.7	Vi khuẩn kháng thuốc hệ thống tự động
42	31	Vi nấm kháng thuốc hệ thống tự động	24.7	Vi nấm kháng thuốc trên máy tự động
43	32	Virus Ag miễn dịch bán tự động	24.109	Virus Ag miễn dịch bán tự động
44	33	Virus Ag miễn dịch tự động	24.110	Virus Ag miễn dịch tự động
45	358	Dengue virus NS1Ag miễn dịch tự động	24.110	Virus Ag miễn dịch tự động
46	397	Adenovirus miễn dịch tự động	24.110	Virus Ag miễn dịch tự động
47	423	Rotavirus Ag miễn dịch tự động	24.110	Virus Ag miễn dịch tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
48	34	Virus Ab miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
49	250	Zika virus IgM miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
50	251	Zika virus IgG miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
51	264	Mumps virus IgM miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
52	265	Mumps virus IgG miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
53	270	Chikungunia virus IgM miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
54	271	Chikungunia virus IgG miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
55	278	SARS-CoV-2 IgG miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
56	279	SARS-CoV-2 IgM miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
57	410	Influenza virus IgG miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
58	411	Influenza virus IgA miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
59	435	VZV IgM miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
60	436	VZV IgG miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
61	520	Parvo virus B19 IgM miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
62	521	Parvo virus B19 IgG miễn dịch bán tự động	24.111	Virus Ab miễn dịch bán tự động
63	35	Virus Ab miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
64	252	Zika virus IgM miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
65	253	Zika virus IgG miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
66	255	Parvo virus B19 IgM miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
67	256	Parvo virus B19 IgG miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
68	266	Mumps virus IgM miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
69	267	Mumps virus IgG miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
70	272	Chikungunia virus IgM miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
71	273	Chikungunia virus IgG miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
72	280	SARS-CoV-2 IgG miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
73	281	SARS-CoV-2 IgM miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
74	282	SARS-CoV-2 Ab total miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
75	359	Dengue virus IgM miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
76	360	Dengue virus IgG miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
77	388	EBV EA-D IgG miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
78	389	EBV EB-NA IgG miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
79	412	Influenza virus IgA miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
80	413	Influenza virus IgG miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
81	526	SARS-CoV-2 S Ab miễn dịch tự động	24.112	Virus Ab miễn dịch tự động
82	36	Streptococcus pyogenes ASO miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
83	173	Bordetella pertussis IgG miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
84	174	Bordetella pertussis IgM miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
85	183	Chlamydia trachomatis IgG miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
86	184	Chlamydia trachomatis IgM miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
87	185	Chlamydia pneumoniae IgG miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
88	186	Chlamydia pneumoniae IgM miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
89	187	Chlamydia trachomatis IgA miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
90	208	Leptospira IgG miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
91	209	Leptospira IgM miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
92	232	Rickettsia tsutsugamushi miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
93	519	Treponema pallidum RPR định lượng hệ thống tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
94	37	Vi khuẩn Ag miễn dịch bán tự động	24.341	Vi khuẩn Ag miễn dịch bán tự động
95	200	Helicobacter pylori Ag miễn dịch bán tự động	24.341	Vi khuẩn Ag miễn dịch bán tự động
96	38	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
97	171	Bordetella pertussis IgG miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
98	172	Bordetella pertussis IgM miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
99	178	Chlamydia trachomatis IgG miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
100	179	Chlamydia trachomatis IgM miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
101	180	Chlamydia pneumoniae IgG miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
102	181	Chlamydia pneumoniae IgM miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
103	201	Helicobacter pylori Ab miễn dịch tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
104	206	Leptospira IgG miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
105	207	Leptospira IgM miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
106	213	Legionella pneumophila IgG miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
107	214	Legionella pneumophila IgM miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
108	230	Rickettsia tsutsugamushi miễn dịch bán tự động	24.343	Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động
109	39	Vi khuẩn Ag miễn dịch tự động	24.340	Vi khuẩn Ag miễn dịch tự động
110	202	Helicobacter pylori Ag miễn dịch tự động	24.340	Vi khuẩn Ag miễn dịch tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
111	248	Campylobacter Ag miễn dịch tự động	24.340	Vi khuẩn Ag miễn dịch tự động
112	40	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động	24.342	Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động
113	41	Vi nấm Ag miễn dịch bán tự động	24.349	Vi nấm Ag miễn dịch bán tự động
114	481	Aspergillus Ag miễn dịch bán tự động	24.349	Vi nấm Ag miễn dịch bán tự động
115	486	Aspergillus galactomanan định lượng	24.349	Vi nấm Ag miễn dịch bán tự động
116	42	Vi nấm Ab miễn dịch bán tự động	24.351	Vi nấm Ab miễn dịch bán tự động
117	482	Aspergillus Ab miễn dịch bán tự động	24.351	Vi nấm Ab miễn dịch bán tự động
118	483	Aspergillus fumigatus IgG miễn dịch bán tự động	24.351	Vi nấm Ab miễn dịch bán tự động
119	484	Aspergillus fumigatus IgM miễn dịch bán tự động	24.351	Vi nấm Ab miễn dịch bán tự động
120	43	Vi nấm Ag miễn dịch tự động	24.348	Vi nấm Ag miễn dịch tự động
121	485	Aspergillus Ag miễn dịch tự động	24.348	Vi nấm Ag miễn dịch tự động
122	44	Vi nấm Ab miễn dịch tự động	24.350	Vi nấm Ab miễn dịch tự động
123	45	Vi khuẩn kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)	24.8	Vi khuẩn kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)
124	46	Neisseria gonorrhoeae kháng thuốc định lượng (MIC)	24.8	Vi khuẩn kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)
125	47	Vi nấm kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)	24.326	Vi nấm kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
126	48	Vi khuẩn kháng sinh phối hợp	24.9	Vi khuẩn kháng sinh phối hợp
127	49	Vi khuẩn kỵ khí nuôi cấy và định danh	24.10	Vi khuẩn kỵ khí nuôi cấy và định danh
128	50	Helicobacter pylori nuôi cấy, định danh	24.10	Vi khuẩn kỵ khí nuôi cấy và định danh
129	51	Vi khuẩn vi hiếu khí nuôi cấy và định danh	24.10	Vi khuẩn kỵ khí nuôi cấy và định danh
130	52	Clostridium nuôi cấy, định danh	24.68	Clostridium nuôi cấy, định danh
131	59	Vi khuẩn kháng định	24.11	Vi khuẩn kháng định
132	60	Vi khuẩn định danh PCR	24.12	Vi khuẩn định danh PCR
133	61	Vi khuẩn định danh Real- time PCR	24.353	Vi khuẩn Real-time PCR
134	63	Vi khuẩn Real-time PCR	24.353	Vi khuẩn Real-time PCR
135	211	Leptospira Real-time PCR	24.353	Vi khuẩn Real-time PCR
136	234	Rickettsia Real-time PCR	24.353	Vi khuẩn Real-time PCR
137	403	Hantavirus Real-time PCR	24.353	Vi khuẩn Real-time PCR
138	515	Mycoplasma genitalium Real-time PCR	24.353	Vi khuẩn Real-time PCR
139	535	MTB-NTM (Mycobacterium tuberculosis-Non tuberculous mycobacteria) Real-time PCR	24.353	Vi khuẩn Real-time PCR
140	64	Candida Real-time PCR	24.354	Vi nấm Real-time PCR
141	66	Vi nấm Real-time PCR	24.354	Vi nấm Real-time PCR

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
142	488	Pneumocystis jirovecii real time PCR	24.354	Vi nấm Real-time PCR
143	489	Aspergillus Real-time PCR	24.354	Vi nấm Real-time PCR
144	540	Pneumocystis carinii PCR	24.354	Vi nấm Real-time PCR
145	68	Virus Real-time PCR	24.115	Virus Real-time PCR
146	254	Zika virus Real-time PCR	24.115	Virus Real-time PCR
147	257	Parvo virus B19 đo tải lượng Real-time PCR	24.115	Virus Real-time PCR
148	258	HDV Real-time PCR	24.115	Virus Real-time PCR
149	259	HEV Real-time PCR	24.115	Virus Real-time PCR
150	268	Mumps virus Real-time PCR	24.115	Virus Real-time PCR
151	274	Chikungunia virus Real- time PCR	24.115	Virus Real-time PCR
152	69	Vi khuẩn định danh giải trình tự gene	24.13	Vi khuẩn định danh giải trình tự gene
153	70	Vi khuẩn kháng thuốc giải trình tự gene	24.15	Vi khuẩn kháng thuốc giải trình tự gene
154	72	Vibrio cholerae giải trình tự gene	24.48	Vibrio cholerae giải trình tự gene
155	73	Neisseria gonorrhoeae kháng thuốc giải trình tự gen	24.55	Neisseria gonorrhoeae kháng thuốc giải trình tự gene
156	74	Chlamydia giải trình tự gene	24.67	Chlamydia giải trình tự gene
157	75	Helicobacter pylori giải trình tự gene	24.79	Helicobacter pylori giải trình tự gene
158	76	Virus giải trình tự gene	24.116	Virus giải trình tự gene

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
159	77	HBV genotype giải trình tự gene	24.141	HBV genotype giải trình tự gene
160	78	HBV kháng thuốc giải trình tự gene	24.143	HBV kháng thuốc giải trình tự gene
161	518	Virus kháng thuốc giải trình tự gene	24.143	HBV kháng thuốc giải trình tự gene
162	79	HCV genotype giải trình tự gene	24.154	HCV genotype giải trình tự gene
163	80	HIV kháng thuốc giải trình tự gene	24.181	HIV kháng thuốc giải trình tự gene
164	81	HIV genotype giải trình tự gene	24.182	HIV genotype giải trình tự gene
165	82	EV71 genotype giải trình tự gene	24.228	EV71 genotype giải trình tự gene
166	83	Enterovirus genotype giải trình tự gene	24.231	Enterovirus genotype giải trình tự gene
167	84	HPV genotype giải trình tự gene	24.242	HPV genotype giải trình tự gene
168	85	Influenza virus A, B giải trình tự gene	24.245	Influenza virus A, B giải trình tự gene (*)
169	86	Rubella virus giải trình tự gene	24.262	Rubella virus giải trình tự gene
170	89	Ký sinh trùng xác định trình tự một đoạn gen	24.357	Ký sinh trùng xác định trình tự một đoạn gen
171	90	Vi khuẩn kháng thuốc PCR	24.14	Vi khuẩn kháng thuốc PCR
172	91	Vi khuẩn kháng thuốc Real-time PCR	24.14	Vi khuẩn kháng thuốc PCR
173	93	Carbapenemase test nhanh	BS_24.376	Test nhanh phát hiện enzym kháng thuốc

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
174	513	Enzym MCR kháng Colistin test nhanh	BS_24.376	Test nhanh phát hiện enzym kháng thuốc
175	514	ESBLs test nhanh	BS_24.376	Test nhanh phát hiện enzym kháng thuốc
176	95	Vi sinh vật nhiễm khuẩn huyết Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.369	Vi sinh vật nhiễm khuẩn huyết Real - time PCR đa môi
177	96	Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.370	Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp Real - time PCR đa môi
178	97	Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường ruột Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.371	Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường ruột Real - time PCR đa môi
179	98	Vi sinh vật nhiễm khuẩn não - màng não Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.372	Vi sinh vật nhiễm khuẩn não - màng não Real - time PCR đa môi
180	101	AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang	24.18	AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang
181	122	HIV đo tải lượng - Xpert	24.113	Virus Xpert
182	523	HCV Xpert	24.113	Virus Xpert
183	125	MTB (Mycobacterium tuberculosis) PCR hệ thống tự động	24.31	Mycobacterium tuberculosis PCR hệ thống tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
184	127	MTB (Mycobacterium tuberculosis) Real-time PCR	24.32	Mycobacterium tuberculosis Real-time PCR
185	128	NTM (Nontuberculous mycobacteria) định danh Real-time PCR	24.38	NTM (Non tuberculosis mycobacteria) định danh Real-time PCR
186	137	Đơn bào đường ruột nhuộm soi	24.266	Đơn bào đường ruột nhuộm soi
187	138	Trứng giun soi tập trung	24.268	Trứng giun soi tập trung
188	139	Filaria (Giun chỉ) ấu trùng trong máu nhuộm soi	24.284	Filaria (Giun chỉ) ấu trùng trong máu nhuộm soi
189	140	Demodex nhuộm soi	24.306	Demodex nhuộm soi
190	141	Phthirus pubis (Rận mu) nhuộm soi	24.308	Phthirus pubis (Rận mu) nhuộm soi
191	142	Sarcoptes scabies hominis (Ghẻ) nhuộm soi	24.310	Sarcoptes scabies hominis (Ghẻ) nhuộm soi
192	143	Cysticercus cellulosae (Sán lợn) ấu trùng soi mảnh sinh thiết	24.311	Cysticercus cellulosae (Sán lợn) ấu trùng soi mảnh sinh thiết
193	144	Gnathostoma ấu trùng soi mảnh sinh thiết	24.312	Gnathostoma ấu trùng soi mảnh sinh thiết
194	145	Pneumocystis jirovecii nhuộm soi	24.313	Pneumocystis jirovecii nhuộm soi
195	146	Taenia (Sán dây) soi tươi định danh	24.314	Taenia (Sán dây) soi tươi định danh
196	147	Toxocara (Giun đũa chó, mèo) soi mảnh sinh thiết	24.315	Toxocara (Giun đũa chó, mèo) soi mảnh sinh thiết
197	148	Trichinella spiralis (Giun xoắn) soi mảnh sinh thiết	24.316	Trichinella spiralis (Giun xoắn) soi mảnh sinh thiết

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
198	149	Trichomonas vaginalis nhuộm soi	24.318	Trichomonas vaginalis nhuộm soi
199	150	Xét nghiệm soi đờm tìm trứng sán lá phổi	24.321	Trứng giun, sán soi tươi
200	151	Vi nấm nhuộm soi	24.321	Vi nấm nhuộm soi
201	152	Vibrio cholerae soi tươi	24.42	Vibrio cholerae soi tươi
202	153	Treponema pallidum soi tươi	24.95	Treponema pallidum soi tươi
203	154	Hồng cầu, bạch cầu trong phân soi tươi	24.263	Hồng cầu, bạch cầu trong phân soi tươi
204	155	Đơn bào đường ruột soi tươi	24.265	Đơn bào đường ruột soi tươi
205	156	Trứng giun, sán soi tươi	24.267	Trứng giun, sán soi tươi
206	157	Strongyloides stercoralis (Giun lươn) ấu trùng soi tươi	24.269	Strongyloides stercoralis (Giun lươn) ấu trùng soi tươi
207	158	Demodex soi tươi	24.305	Demodex soi tươi
208	159	Phthirus pubis (Rận mu) soi tươi	24.307	Phthirus pubis (Rận mu) soi tươi
209	160	Sarcoptes scabies hominis (Ghẻ) soi tươi	24.309	Sarcoptes scabies hominis (Ghẻ) soi tươi
210	161	Trichomonas vaginalis soi tươi	24.317	Trichomonas vaginalis soi tươi
211	162	Vi nấm soi tươi	24.319	Vi nấm soi tươi
212	163	Vibrio cholerae PCR	24.46	Vibrio cholerae PCR
213	164	Vibrio cholerae Real-time PCR	24.47	Vibrio cholerae Real- time PCR
214	165	Neisseria gonorrhoeae PCR	24.51	Neisseria gonorrhoeae PCR

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
215	166	Neisseria gonorrhoeae Real-time PCR	24.51; 24.52; 24.53	Neisseria gonorrhoeae Real-time PCR
216	167	Neisseria gonorrhoeae Real-time PCR hệ thống tự động	24.53	Neisseria gonorrhoeae Real-time PCR hệ thống tự động
217	168	Chlamydia Real-time PCR hệ thống tự động	24.66	Chlamydia Real-time PCR hệ thống tự động
218	169	Neisseria meningitidis PCR	24.58	Neisseria meningitidis PCR
219	170	Neisseria meningitidis Real-time PCR	24.59	Neisseria meningitidis Real-time PCR
220	176	Chlamydia test nhanh	24.60	Chlamydia test nhanh
221	177	Chlamydia Ab miễn dịch bán tự động	24.62	Chlamydia Ab miễn dịch bán tự động
222	182	Chlamydia Ab miễn dịch tự động	24.63	Chlamydia Ab miễn dịch tự động
223	188	Chlamydia PCR	24.64	Chlamydia PCR
224	189	Chlamydia Real-time PCR	24.65	Chlamydia Real-time PCR
225	190	Clostridium difficile miễn dịch bán tự động	24.69	Clostridium difficile miễn dịch bán tự động
226	191	Clostridium difficile miễn dịch tự động	24.70	Clostridium difficile miễn dịch tự động
227	192	Clostridium difficile độc tố A và B miễn dịch tự động	24.70	Clostridium difficile miễn dịch tự động
228	193	Clostridium difficile độc tố GDH miễn dịch tự động	24.70	Clostridium difficile miễn dịch tự động
229	194	Clostridium difficile PCR	24.71	Clostridium difficile PCR

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
230	196	Helicobacter pylori Ag test nhanh	24.73	Helicobacter pylori Ag test nhanh
231	197	Helicobacter pylori Ab test nhanh	24.74	Helicobacter pylori Ab test nhanh
232	199	Helicobacter pylori Ab miễn dịch bán tự động	24.76	Helicobacter pylori Ab miễn dịch bán tự động
233	204	Helicobacter pylori Real- time PCR	24.78	Helicobacter pylori Real- time PCR
234	205	Leptospira test nhanh	24.80	Leptospira test nhanh
235	210	Leptospira PCR	24.81	Leptospira PCR
236	216	Mycoplasma pneumoniae IgG miễn dịch bán tự động	24.82	Mycoplasma pneumoniae Ab miễn dịch bán tự động
237	217	Mycoplasma pneumoniae IgM miễn dịch bán tự động	24.82	Mycoplasma pneumoniae Ab miễn dịch bán tự động
238	218	Mycoplasma pneumoniae IgG miễn dịch tự động	24.83	Mycoplasma pneumoniae Ab miễn dịch tự động
239	219	Mycoplasma pneumoniae IgM miễn dịch tự động	24.83	Mycoplasma pneumoniae Ab miễn dịch tự động
240	220	Mycoplasma pneumoniae Real-time PCR	24.84	Mycoplasma pneumoniae Real-time PCR
241	227	Mycoplasma hominis Real-time PCR	24.89	Mycoplasma hominis Real-time PCR
242	229	Rickettsia Ab miễn dịch bán tự động	24.90	Rickettsia Ab miễn dịch bán tự động
243	231	Rickettsia Ab miễn dịch tự động	24.91	Rickettsia Ab miễn dịch tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
244	233	SARS-CoV-2 Ag miễn dịch tự động	24.92	Xét nghiệm kháng nguyên SARS-CoV-2 từ bệnh phẩm dịch họng mũi trên máy miễn dịch (mẫu đơn)
245	235	Salmonella Widal	24.93	Salmonella Widal
246	238	Streptococcus pyogenes ASO	24.94	Streptococcus pyogenes ASO
247	239	Treponema pallidum RPR định tính	24.99	Treponema pallidum RPR định tính và định lượng
248	240	Treponema pallidum RPR định lượng	24.99	Treponema pallidum RPR định tính và định lượng
249	241	Treponema pallidum TPHA định tính	24.100	Treponema pallidum TPHA định tính và định lượng
250	242	Treponema pallidum TPHA định lượng	24.100	Treponema pallidum TPHA định tính và định lượng
251	243	Treponema pallidum miễn dịch tự động	24.342	Syphilis miễn dịch tự động
252	245	Treponema pallidum Real- time PCR	24.102	Treponema pallidum Real-time PCR
253	247	Ureaplasma urealyticum Real-time PCR	24.107	Ureaplasma urealyticum Real-time PCR
254	260	CMV đo tải lượng Real- time PCR	24.198	CMV Real - time PCR
255	261	EBV đo tải lượng Real- time PCR	24.223	EBV Real - time PCR
256	262	BK virus đo tải lượng Real-time PCR	24.233	BK/JC virus Real - time PCR

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
257	263	JC virus đo tải lượng Real-time PCR	24.233	BK/JC virus Real - time PCR
258	275	SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật Real-time RT PCR	BS_24.405	Xét nghiệm SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR
259	276	SARS-CoV-2 Ag test nhanh	24.108	Xét nghiệm SARS-CoV-2 Ag test nhanh
260	283	HBsAg test nhanh	24.117	HBsAg test nhanh
261	284	HBsAb test nhanh	24.122	HBsAb test nhanh
262	285	HBcAb test nhanh	24.127	HBcAb test nhanh
263	286	HBsAg miễn dịch bán tự động	24.118	HBsAg miễn dịch bán tự động
264	287	HBsAb miễn dịch bán tự động	24.123	HBsAb miễn dịch bán tự động
265	288	HBsAg miễn dịch tự động	24.119	HBsAg miễn dịch tự động
266	290	HBsAg khẳng định	24.120	HBsAg khẳng định
267	291	HBsAg định lượng	24.121	HBsAg định lượng
268	289	HBsAb miễn dịch tự động	24.124	HBsAb định lượng
269	292	HBsAb định lượng	24.124	HBsAb định lượng
270	293	HBc IgM miễn dịch bán tự động	24.125	HBc IgM miễn dịch bán tự động
271	294	HBc total miễn dịch bán tự động	24.128	HBc total miễn dịch bán tự động
272	295	HBc IgM miễn dịch tự động	24.126	HBc IgM miễn dịch tự động
273	296	HBc total miễn dịch tự động	24.129	HBc total miễn dịch tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
274	297	HBcrAg miễn dịch tự động	BS_23.277	HBcrAg miễn dịch tự động
275	298	HBeAg test nhanh	24.130	HBeAg test nhanh
276	299	HBeAb test nhanh	24.133	HBeAb test nhanh
277	300	HBeAg miễn dịch bán tự động	24.131	HBeAg miễn dịch bán tự động
278	301	HBeAb miễn dịch bán tự động	24.134	HBeAb miễn dịch bán tự động
279	302	HBeAg miễn dịch tự động	24.132	HBeAg miễn dịch tự động
280	303	HBeAb miễn dịch tự động	24.135	HBeAb miễn dịch tự động
281	305	HBV đo tải lượng Real- time PCR	24.136	HBV đo tải lượng Real- time PCR
282	306	HBV đo tải lượng hệ thống tự động	24.137	HBV đo tải lượng hệ thống tự động
283	308	HBV genotype Real-time PCR	24.140	HBV genotype Real-time PCR
284	309	HCV genotype Real-time PCR	24.153	HCV genotype Real-time PCR
285	310	HPV genotype Real-time PCR	24.240	HPV genotype Real-time PCR
286	311	Virus genotype Real-time PCR (cho một loại Vi sinh vật)	24.352	Virus genotype Real- time PCR (cho một loại vi sinh vật)
287	312	HBV kháng thuốc Real- time PCR (cho 1 loại thuốc)	24.142	HBV kháng thuốc Real- time PCR (cho 1 loại thuốc)
288	313	HCV Ab test nhanh	24.144	HCV Ab test nhanh
289	314	HCV Ab miễn dịch bán tự động	24.145	HCV Ab miễn dịch bán tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
290	315	HCV Ag/Ab miễn dịch bán tự động	24.147	HCV Ag/Ab miễn dịch bán tự động
291	316	HCV Ab miễn dịch tự động	24.146	HCV Ab miễn dịch tự động
292	317	HCV Ag/Ab miễn dịch tự động	24.148	HCV Ag/Ab miễn dịch tự động
293	319	HCV Core Ag miễn dịch tự động	24.149	HCV Core Ag miễn dịch tự động
294	320	HCV PCR	24.150	HCV PCR
295	321	EBV PCR	24.222	EBV PCR
296	322	Rotavirus PCR	24.251	Rotavirus PCR
297	323	HCV đo tải lượng Real- time PCR	24.151	HCV đo tải lượng Real- time PCR
298	324	HCV đo tải lượng hệ thống tự động	24.152	HCV đo tải lượng hệ thống tự động
299	325	HAV Ab test nhanh	24.155	HAV Ab test nhanh
300	326	HAV IgM miễn dịch bán tự động	24.156	HAV IgM miễn dịch bán tự động
301	327	HAV total miễn dịch bán tự động	24.158	HAV total miễn dịch bán tự động
302	328	HAV IgM miễn dịch tự động	24.157	HAV IgM miễn dịch tự động
303	329	HAV total miễn dịch tự động	24.159	HAV total miễn dịch tự động
304	330	HDV Ag miễn dịch bán tự động	24.160	HDV Ag miễn dịch bán tự động
305	331	HDV IgM miễn dịch bán tự động	24.161	HDV IgM miễn dịch bán tự động
306	332	HDV Ab miễn dịch bán tự động	24.162	HDV Ab miễn dịch bán tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
307	333	HEV Ab test nhanh	24.163	HEV Ab test nhanh
308	334	HEV IgM test nhanh	24.164	HEV IgM test nhanh
309	335	HEV IgM miễn dịch bán tự động	24.165	HEV IgM miễn dịch bán tự động
310	336	HEV IgG miễn dịch bán tự động	24.167	HEV IgG miễn dịch bán tự động
311	337	HEV IgM miễn dịch tự động	24.166	HEV IgM miễn dịch tự động
312	338	HEV IgG miễn dịch tự động	24.168	HEV IgG miễn dịch tự động
313	339	HIV Ab test nhanh	24.169	HIV Ab test nhanh
314	340	HIV Ag/Ab test nhanh	24.170	HIV Ag/Ab test nhanh
315	342	HIV Ab miễn dịch bán tự động	24.171	HIV Ab miễn dịch bán tự động
316	343	HIV Ag/Ab miễn dịch bán tự động	24.173	HIV Ag/Ab miễn dịch bán tự động
317	344	HIV Ab miễn dịch tự động	24.172	HIV Ab miễn dịch tự động
318	345	HIV Ag/Ab miễn dịch tự động	24.174	HIV Ag/Ab miễn dịch tự động
319	346	HIV khẳng định	24.175	HIV khẳng định (*)
320	347	HIV DNA PCR	24.177	HIV DNA PCR
321	348	HIV DNA Real-time PCR	24.178	HIV DNA Real-time PCR
322	349	HIV đo tải lượng Real-time PCR	24.179	HIV đo tải lượng Real-time PCR
323	350	HIV đo tải lượng hệ thống tự động	24.180	HIV đo tải lượng hệ thống tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
324	351	Dengue virus NS1Ag test nhanh	24.183	Dengue virus NS1Ag test nhanh
325	352	Dengue virus IgA test nhanh	24.185	Dengue virus IgA test nhanh
326	353	Dengue virus IgM/IgG test nhanh	24.187	Dengue virus IgM/IgG test nhanh
327	354	Dengue virus NS1Ag/IgM/IgG test nhanh	24.184	Dengue virus NS1Ag/IgM - IgG test nhanh
328	355	Dengue virus NS1Ag miễn dịch bán tự động	24.186	Dengue virus NS1Ag miễn dịch bán tự động
329	356	Dengue virus IgM miễn dịch bán tự động	24.188	Dengue virus IgM miễn dịch bán tự động
330	357	Dengue virus IgG miễn dịch bán tự động	24.189	Dengue virus IgG miễn dịch bán tự động
331	361	Dengue virus PCR	24.190	Dengue virus PCR
332	362	Dengue virus Real-time PCR	24.191	Dengue virus Real-time PCR
333	363	Dengue virus serotype PCR	24.192	Dengue virus serotype PCR
334	364	CMV IgM miễn dịch bán tự động	24.193	CMV IgM miễn dịch bán tự động
335	365	CMV IgG miễn dịch bán tự động	24.195	CMV IgG miễn dịch bán tự động
336	366	CMV IgM miễn dịch tự động	24.194	CMV IgM miễn dịch tự động
337	367	CMV IgG miễn dịch tự động	24.196	CMV IgG miễn dịch tự động
338	368	CMV đo tải lượng hệ thống tự động	24.199	CMV đo tải lượng hệ thống tự động
339	369	CMV Avidity	24.200	CMV Avidity

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
340	370	Rubella virus Avidity	24.259	Rubella virus Avidity
341	371	Toxoplasma Avidity	24.302	Toxoplasma Avidity
342	372	HSV 1+2 IgM miễn dịch bán tự động	24.209	HSV 1+2 IgM miễn dịch bán tự động
343	373	HSV 1+2 IgG miễn dịch bán tự động	24.211	HSV 1+2 IgG miễn dịch bán tự động
344	374	HSV 1 IgG miễn dịch tự động	24.204	HSV 1 IgG miễn dịch tự động
345	375	HSV 2 IgG miễn dịch tự động	24.208	HSV 2 IgG miễn dịch tự động
346	376	HSV 1+2 IgM miễn dịch tự động	24.210	HSV 1+2 IgM miễn dịch tự động
347	377	HSV 1+2 IgG miễn dịch tự động	24.212	HSV 1+2 IgG miễn dịch tự động
348	378	HSV Real-time PCR	24.213	HSV Real-time PCR
349	379	HSV đo tải lượng hệ thống tự động	24.214	HSV đo tải lượng hệ thống tự động
350	380	EBV đo tải lượng hệ thống tự động	24.224	EBV đo tải lượng hệ thống tự động
351	381	VZV Real-time PCR	24.215	VZV Real-time PCR
352	382	EBV-VCA IgM miễn dịch bán tự động	24.216	EBV-VCA IgM miễn dịch bán tự động
353	383	EBV-VCA IgG miễn dịch bán tự động	24.218	EBV-VCA IgG miễn dịch bán tự động
354	384	EBV EA-D IgG miễn dịch bán tự động	24.220	EBV EA-D IgG miễn dịch bán tự động
355	385	EBV EB-NA IgG miễn dịch bán tự động	24.221	EBV EB-NA IgG miễn dịch bán tự động
356	386	EBV-VCA IgM miễn dịch tự động	24.217	EBV IgM miễn dịch tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
357	387	EBV-VCA IgG miễn dịch tự động	24.219	EBV IgG miễn dịch tự động
358	390	EV71 IgM/IgG test nhanh	24.225	EV71 IgM/IgG test nhanh
359	392	EV71 PCR	24.226	EV71 PCR
360	393	EV71 Real-time PCR	24.227	EV71 Real-time PCR
361	394	Enterovirus PCR	24.229	Enterovirus PCR
362	395	Enterovirus Real-time PCR	24.230	Enterovirus Real-time PCR
363	398	Adenovirus Real-time PCR	24.232	Adenovirus Real-time PCR
364	399	Coronavirus PCR	24.234	Coronavirus PCR
365	400	Coronavirus Real-time PCR	24.235	Coronavirus Real-time PCR
366	401	Hantavirus test nhanh	24.236	Hantavirus test nhanh
367	402	Hantavirus PCR	24.237	Hantavirus PCR
368	404	HPV PCR	24.238	HPV PCR
369	405	HPV Real-time PCR	24.239	HPV Real-time PCR
370	406	HPV genotype Real-time PCR hệ thống tự động	24.241	HPV genotype PCR hệ thống tự động
371	407	HPV genotype PCR hệ thống tự động	24.241	HPV genotype PCR hệ thống tự động
372	408	Influenza virus A, B test nhanh	24.243	Influenza virus A, B test nhanh
373	409	Influenza virus A, B Real-time PCR	24.244	Influenza virus A, B Real-time PCR (*)
374	414	JEV IgM miễn dịch bán tự động	24.246	JEV IgM miễn dịch bán tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
375	415	Measles virus IgG miễn dịch bán tự động	24.247	Measles virus Ab miễn dịch bán tự động
376	416	Measles virus IgM miễn dịch bán tự động	24.247	Measles virus Ab miễn dịch bán tự động
377	417	Measles virus IgG miễn dịch tự động	24.248	Measles virus Ab miễn dịch bán tự động
378	418	Measles virus IgM miễn dịch tự động	24.248	Measles virus Ab miễn dịch bán tự động
379	419	Measles virus Real-time PCR	24.115	Measles virus Real - time PCR
380	420	Norovirus test nhanh	24.108	Norovirus test nhanh
381	421	Rotavirus test nhanh	24.249	Rotavirus test nhanh
382	422	Rotavirus Ag miễn dịch bán tự động	24.250	Rotavirus Ag miễn dịch bán tự động
383	424	RSV Ab miễn dịch bán tự động	24.252	RSV Ab miễn dịch bán tự động
384	425	RSV Real-time PCR	24.253	RSV Real-time PCR
385	427	Rubella virus Ab test nhanh	24.254	Rubella virus Ab test nhanh
386	428	Rubella virus IgM miễn dịch bán tự động	24.255	Rubella virus IgM miễn dịch bán tự động
387	429	Rubella virus IgG miễn dịch bán tự động	24.257	Rubella virus IgM miễn dịch tự động
388	430	Rubella virus IgM miễn dịch tự động	24.256	Rubella virus IgG miễn dịch bán tự động
389	431	Rubella virus IgG miễn dịch tự động	24.258	Rubella virus IgG miễn dịch tự động
390	433	Rubella virus PCR	24.260	Rubella virus PCR
391	434	Rubella virus Real-time PCR	24.261	Rubella virus Real-time PCR

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
392	437	VZV IgM miễn dịch tự động	24.112	VZV IgM miễn dịch tự động
393	438	VZV IgG miễn dịch tự động	24.112	VZV IgG miễn dịch tự động
394	441	Hồng cầu trong phân test nhanh	24.264	Hồng cầu trong phân test nhanh
395	442	Angiostrogylus cantonensis (Giun tròn chuột) Ab miễn dịch bán tự động	24.272	Angiostrogylus cantonensis (Giun tròn chuột) Ab miễn dịch bán tự động
396	443	Clonorchis/Opisthorchis (Sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch bán tự động	24.274	Clonorchis/Opisthorchis (Sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch bán tự động
397	444	Cysticercus cellulosae (Sán lợn) Ab miễn dịch bán tự động	24.276	Cysticercus cellulosae (Sán lợn) Ab miễn dịch bán tự động
398	445	Echinococcus granulosus (Sán dây chó) Ab miễn dịch bán tự động	24.278	Echinococcus granulosus (Sán dây chó) Ab miễn dịch bán tự động
399	447	Entamoeba histolytica (Amip) Ab miễn dịch bán tự động	24.280	Entamoeba histolytica (Amip) Ab miễn dịch bán tự động
400	448	Fasciola (Sán lá gan lớn) Ab miễn dịch bán tự động	24.282	Fasciola (Sán lá gan lớn) Ab miễn dịch bán tự động
401	449	Gnathostoma (Giun đầu gai) Ab miễn dịch bán tự động	24.285	Gnathostoma (Giun đầu gai) Ab miễn dịch bán tự động
402	450	Paragonimus (Sán lá phổi) Ab miễn dịch bán tự động	24.287	Paragonimus (Sán lá phổi) Ab miễn dịch bán tự động
403	451	Schistosoma (Sán máng) Ab miễn dịch bán tự động	24.292	Schistosoma (Sán máng) Ab miễn dịch bán tự động
404	452	Strongyloides stercoralis (Giun lươn) Ab miễn dịch bán tự động	24.294	Strongyloides stercoralis (Giun lươn) Ab miễn dịch bán tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
405	453	Toxocara (Giun đũa chó, mèo) Ab miễn dịch bán tự động	24.296	Toxocara (Giun đũa chó, mèo) Ab miễn dịch bán tự động
406	454	Trichinella spiralis (Giun xoắn) Ab miễn dịch bán tự động	24.303	Trichinella spiralis (Giun xoắn) Ab miễn dịch bán tự động
407	455	Ký sinh trùng Ag miễn dịch bán tự động	24.345	Ký sinh trùng Ag miễn dịch bán tự động
408	446	Taenia solium (sán dây lợn) Ab miễn dịch bán tự động	24.347	Ký sinh trùng Ab miễn dịch bán tự động
409	456	Ký sinh trùng Ab miễn dịch bán tự động	24.347	Ký sinh trùng Ab miễn dịch bán tự động
410	457	Angiostrogylus cantonensis (Giun tròn chuột) Ab miễn dịch tự động	24.273	Angiostrogylus cantonensis (Giun tròn chuột) Ab miễn dịch tự động
411	458	Clonorchis/Opisthorchis (Sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch tự động	24.275	Clonorchis/Opisthorchis (Sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch tự động
412	459	Cysticercus cellulosae (Sán lợn) Ab miễn dịch tự động	24.277	Cysticercus cellulosae (Sán lợn) Ab miễn dịch tự động
413	460	Echinococcus granulosus (Sán dây chó) Ab miễn dịch tự động	24.279	Echinococcus granulosus (Sán dây chó) Ab miễn dịch tự động
414	462	Entamoeba histolytica (Amip) Ab miễn dịch tự động	24.281	Entamoeba histolytica (Amip) Ab miễn dịch tự động
415	463	Fasciola (Sán lá gan lớn) Ab miễn dịch tự động	24.283	Fasciola (Sán lá gan lớn) Ab miễn dịch tự động
416	464	Gnathostoma (Giun đầu gai) Ab miễn dịch tự động	24.286	Gnathostoma (Giun đầu gai) Ab miễn dịch tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
417	465	Paragonimus (Sán lá phổi) Ab miễn dịch tự động	24.288	Paragonimus (Sán lá phổi) Ab miễn dịch tự động
418	466	Schistosoma (Sán máng) Ab miễn dịch tự động	24.293	Schistosoma (Sán máng) Ab miễn dịch tự động
419	467	Strongyloides stercoralis (Giun lươn) Ab miễn dịch tự động	24.295	Strongyloides stercoralis (Giun lươn) Ab miễn dịch tự động
420	468	Toxocara (Giun đũa chó, mèo) Ab miễn dịch tự động	24.297	Toxocara (Giun đũa chó, mèo) Ab miễn dịch tự động
421	469	Trichinella spiralis (Giun xoắn) Ab miễn dịch tự động	24.304	Trichinella spiralis (Giun xoắn) Ab miễn dịch tự động
422	470	Ký sinh trùng Ag miễn dịch tự động	24.344	Ký sinh trùng Ag miễn dịch tự động
423	461	Taenia solium (sán dây lợn) Ab miễn dịch tự động	24.346	Ký sinh trùng Ab miễn dịch tự động
424	471	Ký sinh trùng Ab miễn dịch tự động	24.346	Ký sinh trùng Ab miễn dịch tự động
425	472	Plasmodium Real-time PCR	24.355	Ký sinh trùng Real-time PCR
426	473	Trichomonas vaginalis Real-time PCR	24.355	Ký sinh trùng Real-time PCR
427	474	Ký sinh trùng Real-time PCR	24.355	Ký sinh trùng Real-time PCR
428	479	Toxoplasma gondii Real-time PCR	24.355	Ký sinh trùng Real-time PCR
429	475	Toxoplasma IgM miễn dịch bán tự động	24.298	Toxoplasma IgM miễn dịch bán tự động
430	476	Toxoplasma IgG miễn dịch bán tự động	24.300	Toxoplasma IgG miễn dịch bán tự động
431	477	Toxoplasma IgM miễn dịch tự động	24.299	Toxoplasma IgM miễn dịch tự động

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
432	478	Toxoplasma IgG miễn dịch tự động	24.301	Toxoplasma IgG miễn dịch tự động
433	487	Cryptococcus test nhanh	24.338	Cryptococcus test nhanh
434	491	Vi sinh vật cấy kiểm tra không khí	24.329	Vi sinh vật cấy kiểm tra không khí
435	492	Vi sinh vật cấy kiểm tra bàn tay	24.330	Vi sinh vật cấy kiểm tra bàn tay
436	493	Vi sinh vật cấy kiểm tra dụng cụ đã tiệt trùng	24.331	Vi sinh vật cấy kiểm tra dụng cụ đã tiệt trùng
437	494	Vi sinh vật cấy kiểm tra bề mặt	24.332	Vi sinh vật cấy kiểm tra bề mặt
438	495	Vi sinh vật cấy kiểm tra nước sinh hoạt	24.333	Vi sinh vật cấy kiểm tra nước sinh hoạt
439	496	Vi sinh vật cấy kiểm tra nước thải	24.334	Vi sinh vật cấy kiểm tra nước thải
440	497	Vi khuẩn kháng thuốc - Phát hiện người mang	24.335	Vi khuẩn kháng thuốc - Phát hiện người mang
441	498	Vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện - Phát hiện nguồn nhiễm	24.336	Vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện - Phát hiện nguồn nhiễm
442	500	Vi sinh vật định danh PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)	BS_24.377	Vi sinh vật định danh PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)
443	501	Vi sinh vật nhiễm khuẩn huyết PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.377	Vi sinh vật định danh PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
444	502	Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp trên PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.377	Vi sinh vật định danh PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)
445	503	Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp dưới PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.377	Vi sinh vật định danh PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)
446	504	Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường tiêu hóa PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)	BS_24.377	Vi sinh vật định danh PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)
447	505	Vi sinh vật nhiễm khuẩn não - màng não PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.377	Vi sinh vật định danh PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)
448	531	Vi sinh vật nhiễm khuẩn khớp PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.377	Vi sinh vật định danh PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)
449	222	Mycoplasma hominis nuôi cấy, định danh	24.87	Mycoplasma hominis nuôi cấy, định danh và kháng thuốc
450	223	Ureaplasma urealyticum nuôi cấy, định danh	24.87	Ureaplasma urealyticum nuôi cấy, định danh và kháng thuốc

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
451	224	Mycoplasma hominis kháng thuốc	24.87	Mycoplasma hominis nuôi cấy, định danh và kháng thuốc
452	225	Ureaplasma urealyticum kháng thuốc	24.87	Ureaplasma urealyticum nuôi cấy, định danh và kháng thuốc
453	529	Mycoplasma hominis & Ureaplasma spp. nuôi cấy định danh, kháng sinh đồ	24.105	Ureaplasma urealyticum nuôi cấy, định danh và kháng thuốc
454	537	Candida Ag miễn dịch bán tự động	24.349	Tìm kháng nguyên Candida bằng kỹ thuật ELISA
455	541	Xác định gen Virus cúm A bằng kỹ thuật RT-PCR	BS_24.403	Xác định gen Virus cúm A bằng kỹ thuật RT-PCR

DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ATSH		An toàn sinh học
Ab	Antibody	Kháng thể
Ag	Antigen	Kháng nguyên
BCĐN		Bạch cầu đa nhân
CLIA	Chemiluminescence immunoassay	Thử nghiệm miễn dịch hóa phát quang
CLSI	Clinical and laboratory standards institute	Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm
CO	Cut off	Ngưỡng
DNA	Deoxyribonucleic acid	
ECLIA	Electrochemiluminescent ImmunoAssay	Thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay	Miễn dịch hấp phụ gắn enzym
EQA	External Quality Assessment	Ngoại kiểm
EQC	External Quality Control	Kiểm soát chất lượng bằng vật liệu bên ngoài
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	Ủy ban Châu Âu về thử nghiệm nhạy cảm kháng sinh
HBV	Hepatitis B virus	Virus viêm gan B
HCV	Hepatitis C virus	Virus viêm gan C
HIV	Human Immunodeficiency Virus – Virus	Virus gây suy giảm miễn dịch ở người
HPC	High positive control	Chứng dương cao
HT		Huyết thanh
I	Intermediate	Trung gian
IQC	Internal Quality Control	Kiểm soát chất lượng nội bộ
IU	International unit	Đơn vị Quốc tế
KKT		Kháng kháng thể
KN-KT		Kháng nguyên - Kháng thể

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
KSD		Kháng sinh đồ
KST		Ký sinh trùng
LPC	Low positive control	Chứng dương thấp
NC	Negative control	Chứng âm
MIC	Minimum Inhibitory Concentrations	Nồng độ ức chế tối thiểu
OD	Optical density	Mật độ quang
PC	Positive control	Chứng dương
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi
QC	Quality control	Kiểm soát chất lượng
R	Resistant	Đề kháng
RNA	Ribonucleic acid	
RT – PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi phiên mã ngược
S	Susceptible	Nhạy cảm
VD		Ví dụ
VK		Vi khuẩn
VSV		Vi sinh vật

1. Vi khuẩn nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nhận định sơ bộ hình ảnh vi khuẩn và các hình ảnh tế bào (nếu có) trực tiếp từ bệnh phẩm bằng kỹ thuật nhuộm soi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đánh giá hình thể, kích thước, tính chất bắt màu, cách sắp xếp của vi khuẩn và các hình ảnh tế bào (nếu có) bằng kỹ thuật nhuộm và soi dưới kính hiển vi quang học.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin (hoặc safranin)
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Dầu soi kính
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Que gỗ lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Các loại bệnh phẩm được chỉ định xét nghiệm vi khuẩn.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Chuẩn bị tiêu bản nhuộm
- Nhỏ dung dịch tím gentian, phủ kín nơi dàn đồ phiến, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch tím gentian, rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy nhẹ
- Nhỏ dung dịch lugol, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch lugol, rửa nước
- Tẩy màu: để nghiêng tiêu bản, nhỏ vài giọt cồn 95% nghiêng đi nghiêng lại tiêu bản đến khi thấy màu tím trên lam kính vừa phai hết thì rửa nước ngay.
- Nhỏ dung dịch đỏ fuchsin (hoặc safranin), để trong 1 phút

- Rửa nước kỹ, để khô tiêu bản, soi kính hiển vi.

4.2. Nhận định kết quả

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt tiêu chuẩn.

4.2.1. Đánh giá hình ảnh vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm Gram

- Soi dưới vật kính dầu (x100)
- Diễn giải và đọc kết quả:
 - + Vi khuẩn Gram (+) bắt màu tím sẫm của gentian.
 - + Vi khuẩn Gram (-) bắt màu đỏ của fuchsin (hoặc safranin).

4.2.2. Đánh giá hình ảnh tế bào trên tiêu bản nhuộm đơn (nếu có).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù qui trình được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Gram dương giả: Tẩy còn chưa đủ thời gian

Gram âm giả:

- Tuổi của mẫu cấy vi khuẩn ảnh hưởng lên tính chất nhuộm Gram ở các mẫu cấy vi khuẩn để thời gian quá lâu.
- Tẩy còn quá lâu và tráng không kỹ.

Nhuộm lại tiêu bản khi nghi ngờ kết quả không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

2. AFB trực tiếp nhuộm Ziehl-Neelsen

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện các trực khuẩn kháng acid (AFB - acid fast bacillus) bằng kỹ thuật nhuộm Zeihl-Neelsen.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Do đặc tính kháng acid của AFB nên khi được nhuộm bằng phương pháp Ziehl-Neelsen và soi dưới kính hiển vi quang học, hình ảnh của AFB sẽ có màu đỏ, các vi khuẩn và các tế bào (nếu có) không có đặc tính kháng acid sẽ có màu xanh.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y..

2.2. Trang thiết bị

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch fuchsin 0,3%
- Dung dịch cồn tẩy HCl 3%
- Dung dịch xanh methylen 0,3%
- Dầu soi kính
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay

- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Các loại bệnh phẩm được chỉ định xét nghiệm vi khuẩn.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Chuẩn bị tiêu bản đạt tiêu chuẩn của Chương trình chống lao quốc gia
- Cố định tiêu bản.
- Nhỏ dung dịch fuchsin phủ kín nơi dàn đồ phiến, hơi nóng cho đến khi bốc hơi (không được sôi), để trong 5 phút. Có thể thêm dung dịch fuchsin nếu tiêu bản bị khô nhưng không hơi nóng lại.
- Rửa nước
- Tẩy màu bằng dung dịch cồn acid cho đến khi phai hết màu đỏ.
- Rửa nước
- Nhỏ dung dịch xanh methylen phủ lên vùng dàn tiêu bản, để trong 1 – 2 phút.
- Đọc và đánh giá kết quả tiêu bản trên kính hiển vi quang học.

4.2. Nhận định kết quả

Quan sát AFB bằng vật kính dầu (x100) trên kính hiển vi quang học. AFB có hình ảnh trực khuẩn mảnh, hơi cong, bắt màu đỏ đứng riêng lẻ hay xếp đôi hoặc từng đám trên nền xanh. Đếm số lượng AFB và ghi kết quả như bảng sau:

Số lượng AFB	Kết quả	Phân loại
Có > 10 AFB/1 vi trường (Soi ít nhất 20 vi trường)	Dương tính	3 +
Có từ 1-10 AFB/1 vi trường (Soi ít nhất 50 vi trường)	Dương tính	2 +
Có từ 10-99 AFB/100 vi trường	Dương tính	1 +
Có từ 1-9 AFB/100 vi trường	Dương tính	Ghi số lượng cụ thể
0 AFB/100 vi trường	Âm tính	

Lưu ý: 1 dòng tương đương 100 vi trường. Soi ít nhất 1 dòng (tiêu bản dương). Soi ít nhất 3 dòng (tiêu bản âm)

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù kỹ thuật xét nghiệm được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiêu bản vẫn còn màu hồng do tẩy chưa đủ thời gian.
- AFB nhạt màu có thể do tẩy quá lâu hoặc nhuộm chưa đủ (thời gian, sức nóng).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

3. *Mycobacterium leprae* nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện các trực khuẩn *Mycobacterium leprae* còn gọi là Bacillus Hansen (BH) bền vững với acid bằng phương pháp nhuộm soi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Do đặc tính kháng acid của *Mycobacterium leprae* nên khi được nhuộm bằng kỹ thuật nhuộm Ziehl-Neelsen và soi dưới kính hiển vi quang học, hình ảnh của *Mycobacterium leprae* sẽ có màu đỏ, các vi khuẩn và các tế bào (nếu có) không có đặc tính kháng acid sẽ xanh.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật viên y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất nhuộm Ziehl-Neelsen
- Lưỡi dao rạch da số 15
- Lam kính
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Hộp đựng dung dịch khử khuẩn ngâm lưỡi dao
- Bông gòn
- Đèn cồn
- Mũ
- Khẩu trang
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Găng tay
- Quần áo bảo hộ
- Bút viết kính
- Bút bi
- Bật lửa
- Sổ lưu kết quả xét nghiệm

- Khăn lau tay
- Giấy lọc thuốc nhuộm
- Giấy trả kết quả xét nghiệm
- QC (nếu thực hiện)
- EQAS (nếu thực hiện)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Dụng cụ sấy lam (nếu có)
- Cán dao rạch da số 3 (Inox).

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Chất tiết và tế bào dưới da ở vị trí dái tai, tổn thương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).
- Nguồn điện ổn định.
- Không để thức ăn nước uống hoặc các vật dụng khác lên trên máy và khu vực máy.
- Hóa chất thuốc thử cần có nhãn rõ ràng, đầy đủ thông tin.
- Tài liệu, dụng cụ theo máy cần được bảo quản riêng lẻ, ngăn nắp và sạch sẽ.
- Đảm bảo đầy đủ dụng cụ bảo hộ cá nhân khi vận hành máy và phân tích mẫu.
- Tất cả các hóa chất, mẫu bệnh phẩm, mẫu chuẩn là những nguy cơ tiềm ẩn lây nhiễm bệnh. Nhân viên phải thực hiện đúng các quy trình kỹ thuật xét nghiệm, quy trình an toàn phòng xét nghiệm, quy trình xử lý chất thải y tế.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện:

4.1.1. Lấy bệnh phẩm: Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh

4.1.2. Tiến trình kỹ thuật: Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh

- Chuẩn bị tiêu bản
- Nhuộm Fuchsin
- Tẩy màu bằng dung dịch cồn acid.
- Nhuộm nền bằng dung dịch xanh Methylene.

Lưu ý: 1 dòng lam tương đương 100 vi trường. Soi ít nhất 3 dòng.

4.2. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.2.1. Trả kết quả

BH có hình ảnh trực khuẩn mảnh, hơi cong, bắt màu đỏ đứng riêng lẻ hay xếp đôi hoặc từng đám trên nền xanh. Đếm số lượng BH và ghi kết quả như bảng sau:

Số lượng BH	Kết quả	Phân loại
Có từ 1 -10 BH/ 100 vi trường	Dương tính	BH 1 (+)
Có từ 1 -10 BH/ 10 vi trường	Dương tính	BH 2 (+)
Có từ 1 -10 BH/ 1 vi trường	Dương tính	BH 3 (+)
Có từ 1 -100 BH/ 1 vi trường	Dương tính	BH 4 (+)
Có từ 100 -1000 BH/ 1 vi trường	Dương tính	BH 5 (+)
Có >1000 BH/ 1 vi trường	Dương tính	BH 6 (+)
Không thấy BH/ 100 vi trường	Âm tính	

4.2.2. Lưu trữ hồ sơ

- Biểu mẫu theo dõi sử dụng thiết bị trong quy trình: Kính hiển vi, tủ ATSH.
- Biên bản hủy mẫu, sổ xét nghiệm, báo cáo hoạt động xét nghiệm, phản hồi kiểm định, kết quả nội kiểm (QC), sổ pha hóa chất.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Bệnh phẩm được lấy, vận chuyển, bảo quản không đúng qui định. Nếu lâm sàng vẫn yêu cầu, phòng xét nghiệm sẽ thông báo mức độ kém chính xác của kết quả xét nghiệm.
- Chất lượng thuốc nhuộm không đạt: nồng độ, công thức

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- BH nhạt màu có thể do tẩy quá lâu hoặc nhuộm chưa đủ (thời gian, sức nóng).
- Nếu BH tối màu có thể do nhuộm nền quá lâu.
- Mỗi mẻ nhuộm không nên quá 12 tiêu bản, các tiêu bản để cách nhau ít nhất 1 cm.
- Soi chưa đủ số vi trường.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Đối chiếu số xét nghiệm và thông tin bệnh nhân không chính xác
- Ghi chép và báo cáo kết quả không chính xác.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT).
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

4. *Mycobacterium leprae* mảnh sinh thiết

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện các trực khuẩn *Mycobacterium leprae* còn gọi là Bacillus Hansen (BH) bền vững với acid từ bệnh phẩm mảnh sinh thiết tổ chức da bằng phương pháp nhuộm soi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Do đặc tính kháng acid của *Mycobacterium leprae* nên khi được nhuộm bằng kỹ thuật nhuộm Ziehl-Neelsen và soi dưới kính hiển vi quang học, hình ảnh của *Mycobacterium leprae* sẽ có màu đỏ, các vi khuẩn và các tế bào (nếu có) không có đặc tính kháng acid sẽ xanh.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật viên y

2.2. Thiết bị y tế

- Formaldehyde
- Toluene
- Cồn tuyệt đối
- Thuốc nhuộm fuchsin
- Thuốc nhuộm xanh Methylene
- Cồn acid 1%
- Paraplasts
- Keo gắn lam kính
- Cassette đúc bệnh phẩm
- Dao cắt bệnh phẩm sử dụng 1 lần
- Lam kính
- Nước cất
- Gạc 30x30 (cm)
- Mũ
- Khẩu trang
- Găng tay
- Quần áo bảo hộ
- Bộ giá đựng tiêu bản

- Máy chuyên
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy đúc
- Máy cắt
- Bể nhuộm
- Tủ âm 56 độ
- Kính hiển vi quang học

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mảnh sinh thiết tổ chức da
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 90 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1 Các bước thực hiện

4.1.1. Lấy bệnh phẩm: Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh

4.1.2. Tiến trình kỹ thuật:

- Cố định bệnh phẩm trong formol
- Chuyển đúc bệnh phẩm
- Nhuộm bệnh phẩm theo phương pháp Ziehl–Neelsen.

4.2. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.2.1. Trả kết quả

Dựa vào số lượng, độ tập trung của trực khuẩn kết hợp với đặc điểm mô bệnh học trên nhuộm tiêu bản nhuộm HE để chẩn đoán các thể.

4.2.2. Lưu hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Bệnh phẩm được lấy, vận chuyển, bảo quản không đúng qui định. Nếu lâm sàng vẫn yêu cầu, phòng xét nghiệm sẽ thông báo mức độ kém chính xác của kết quả xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Trục khuẩn bị mất lớp mỡ do bước tẩy nền bằng xylen
- Khắc phục: phủ lại lam bằng dung dịch xylen với parafin tỷ lệ 1:1

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đối chiếu số xét nghiệm và thông tin bệnh nhân không chính xác
- Ghi chép và báo cáo kết quả không chính xác.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG:

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

5. *Vibrio cholerae* nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nhận định sơ bộ hình ảnh vi khuẩn vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* trực tiếp từ bệnh phẩm bằng kỹ thuật nhuộm soi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đánh giá hình thể, kích thước, tính chất bắt màu bằng kỹ thuật nhuộm và soi dưới kính hiển vi quang học.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.3. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin (hoặc safranin)
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Dầu soi kính
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại

- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Chuẩn bị tiêu bản nhuộm
- Nhỏ dung dịch tím gentian, phủ kín nơi dàn đồ phiến, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch tím gentian, rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy nhẹ
- Nhỏ dung dịch lugol, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch lugol, rửa nước
- Tẩy màu: để nghiêng tiêu bản, nhỏ vài giọt cồn 95% nghiêng đi nghiêng lại tiêu bản đến khi thấy màu tím trên lam kính vừa phai hết thì rửa nước ngay.
- Nhỏ dung dịch đỏ fuchsin (hoặc safranin), để trong 1 phút.
- Rửa nước kỹ, để khô tiêu bản, soi kính hiển vi.

4.2. Nhận định kết quả

Vibrio cholerae có hình ảnh phẩy khuẩn, bắt màu Gram âm (màu đỏ). Khi có hình ảnh nghi ngờ trên tiêu bản nhuộm soi, cần đề nghị nuôi cấy để chẩn đoán xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- *Vibrio cholerae* có thể bắt màu không đúng do tẩy còn chưa đủ hoặc làm lam quá dày; thuốc nhuộm không đảm bảo chất lượng.
- Một số trường hợp trực khuẩn do cố định quá lâu tạo hình ảnh gần giống phẩy khuẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

6. *Neisseria gonorrhoeae* nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nhận định sơ bộ hình ảnh vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae* và các hình ảnh tế bào (nếu có) trực tiếp từ bệnh phẩm bằng kỹ thuật nhuộm soi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đánh giá hình thể, kích thước, tính chất bắt màu, cách sắp xếp đặc trưng của vi khuẩn *N. gonorrhoeae* và các hình ảnh tế bào (nếu có) bằng kỹ thuật nhuộm và soi dưới kính hiển vi quang học.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin (hoặc safranin)
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Thuốc nhuộm xanh Methylen
- Dầu soi kính
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mủ hoặc dịch tiết đường sinh dục, hậu môn, họng...
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Chuẩn bị tiêu bản nhuộm
- Nhỏ dung dịch tím gentian, phủ kín nơi dàn đồ phiến, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch tím gentian, rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy nhẹ
- Nhỏ dung dịch lugol, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch lugol, rửa nước
- Tẩy màu: để nghiêng tiêu bản, nhỏ vài giọt cồn 95% nghiêng đi nghiêng lại tiêu bản đến khi thấy màu tím trên lam kính vừa phai hết thì rửa nước ngay.
- Nhỏ dung dịch đỏ fuchsin (hoặc safranin), để trong 1 phút
- Rửa nước kỹ, để khô tiêu bản, soi kính hiển vi.

4.2. Nhận định kết quả

Nghĩ đến *Neisseria gonorrhoeae* khi quan sát thấy hình ảnh cầu khuẩn Gram âm xếp đôi, hình hạt cà phê nằm trong và ngoài bạch cầu đa nhân trung tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Vi khuẩn nhạt màu có thể do tẩy quá lâu hoặc nhuộm chưa đủ thời gian.
- Nếu vi khuẩn còn màu tím có thể do tẩy chưa đủ thời gian.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

7. *Neisseria meningitidis* nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nhận định sơ bộ hình ảnh vi khuẩn *N.meningitidis* và các hình ảnh tế bào (nếu có) trực tiếp từ bệnh phẩm bằng kỹ thuật nhuộm soi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đánh giá hình thể, kích thước, tính chất bắt màu, cách sắp xếp đặc trưng của vi khuẩn *N. meningitidis* và các hình ảnh tế bào (nếu có) bằng kỹ thuật nhuộm và soi dưới kính hiển vi quang học.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.3. Trang thiết bị

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin (hoặc safranin)
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Dầu soi kính
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Que gỗ lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch não tủy, dịch ngoáy mũi họng, hồng ban trên da.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 30 phút.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Chuẩn bị tiêu bản nhuộm
- Nhỏ dung dịch tím gentian, phủ kín nơi dàn đồ phiến, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch tím gentian, rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy nhẹ
- Nhỏ dung dịch lugol, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch lugol, rửa nước

- Tẩy màu: để nghiêng tiêu bản, nhỏ vài giọt cồn 95% nghiêng đi nghiêng lại tiêu bản đến khi thấy màu tím trên lam kính vừa phai hết thì rửa nước ngay.
- Nhỏ dung dịch đỏ fuchsin (hoặc safranin), để trong 1 phút
- Rửa nước kỹ, để khô tiêu bản, soi kính hiển vi.

4.2. Nhận định kết quả

Nghĩ đến *Neisseria meningitidis* khi quan sát thấy hình ảnh cầu khuẩn Gram âm xếp đôi, hình hạt cà phê nằm trong và ngoài bạch cầu đa nhân trung tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- *Neisseria meningitidis* có thể bắt màu không đúng do tẩy còn chưa đủ hoặc làm đồ phiên quá dày.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

8. *Treponema pallidum* nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này được xây dựng để hướng dẫn cho tất cả nhân viên trong khoa xét nghiệm thực hiện được kỹ thuật nhuộm soi phát hiện xoắn khuẩn *Treponema pallidum*, đảm bảo kết quả xét nghiệm chính xác, tin cậy và kịp thời.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xoắn khuẩn *Treponema pallidum* khi nhuộm Giemsa có sóng hình sin mảnh bắt màu xanh hồng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch nhuộm Giemsa
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dầu soi
- Dung dịch nước muối sinh lý NaCl 0.9%
- Cồn 90 độ
- Vật tư tiêu hao, vật tư thay thế
- Lam kính
- Bút ghi kính
- khay đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Khăn lau tay
- Kính hiển vi quang học

- Máy tính, máy in
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1µl đến 1000µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Dịch tiết ở vết trợt, loét, sẩn, dịch chọc hạch...
- Mẫu được lấy, vận chuyển và bảo quản theo “Sổ tay dịch vụ khách hàng”
- Tiến hành tiếp nhận mẫu bệnh phẩm theo “Hướng dẫn nhận mẫu bệnh phẩm”
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Lấy bệnh phẩm

Tuỳ loại tổn thương có kỹ thuật lấy bệnh phẩm khác nhau

4.1.1. Tổn thương là vết trợt, vết loét:

- Bước 1: Lau sạch tổn thương bằng nước muối sinh lý NaCl 0,9%
- Bước 2: Kẹp chặt thương tổn vào giữa ngón trỏ và ngón cái của bàn tay trái
- Bước 3: Dùng tăm bông sạch thấm nước muối sinh lý làm sạch vết thương
- Bước 4: Dùng ngòi chủng lấy một ít dịch tiết thoát ra
- Bước 5: Dàn dịch tiết lên bề mặt lam kính

4.1.2. Tổn thương là sẩn, đào ban:

- Bước 1: Lau sạch tổn thương bằng nước muối sinh lý NaCl 0,9%
- Bước 2: Dùng ngòi chủng cào nhẹ lên tổn thương lấy ít dịch (tránh làm chảy máu).
- Bước 3: Dàn dịch tiết lên bề mặt lam kính

4.1.3. Tồn thương là hạch:

- Bước 1: Lau sạch tồn thương bằng nước muối sinh lý NaCl 0,9%
- Bước 2: Cố định hạch bằng hai ngón tay
- Bước 3: Dùng bơm tiêm vô trùng bơm vào hạch một ít nước muối sinh lý 0,9%, day nhẹ hạch rồi hút ra một ít dịch.
- Bước 4: Dàn một lượng nhỏ dịch hạch vào lam kính

4.2. Kỹ thuật nhuộm

- Cố định tiêu bản bằng cồn 90 độ
- Nhuộm bằng dung dịch Giemsa mẹ 1-3 phút hoặc pha loãng 1/10 trong khoảng 8- 10 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy
- Để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng

4.3. Nhận định kết quả

- Hình ảnh xoắn khuẩn giống sóng hình sin đều, mảnh, bắt màu xanh hồng

4.4. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả.
- Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể do lấy, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Dàn mẫu bệnh phẩm quá mỏng, quá dày. Tiến hành lấy mẫu lại đảm bảo yêu cầu.
- Thời gian nhuộm không đảm bảo. Tiến hành nhuộm lại, tuân thủ chính xác theo quy trình.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. ISO 15189:2022, *Medical laboratories -Requirements for quality and competence*, 2022
5. Yoshiyuki Sekikawa và cs. *The diagnosis of secondary Syphilis by Gram and Giemsa staining*. The Japanese Society of Internal Medicine, 2017

9. Vi hệ đường ruột

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Đánh giá tỷ lệ các loại vi khuẩn có mặt trong phân bằng kỹ thuật nhuộm soi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa vào quan sát hình thể và tính chất bắt màu khi nhuộm đơn và nhuộm Gram để đánh giá một cách tương đối tỷ lệ các loại vi khuẩn Gram âm, Gram dương có mặt trong phân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin (hoặc safranin)
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Thuốc nhuộm xanh methylen
- Dầu soi kính
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin (hoặc safranin)
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.2.1. Chuẩn bị 2 tiêu bản

4.2.2. Nhuộm đơn bằng xanh methylene 1 tiêu bản

- Chuẩn bị tiêu bản nhuộm
- Nhỏ dung dịch xanh methylene, phủ kín nơi dàn đồ phiến, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch xanh methylene, rửa nước
- Để khô tiêu bản, soi kính hiển vi.

4.2.3. Nhuộm Gram 1 tiêu bản

- Chuẩn bị tiêu bản nhuộm
- Nhỏ dung dịch tím gentian, phủ kín nơi dàn đồ phiến, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch tím gentian, rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy nhẹ
- Nhỏ dung dịch lugol, để trong 1 phút
- Đổ dung dịch lugol, rửa nước
- Tẩy màu: để nghiêng tiêu bản, nhỏ vài giọt cồn 95% nghiêng đi nghiêng lại tiêu bản đến khi thấy màu tím trên lam kính vừa phai hết thì rửa nước ngay.
- Nhỏ dung dịch đỏ fuchsin (hoặc safranin), để trong 1 phút
- Rửa nước kỹ, để khô tiêu bản, soi kính hiển vi.

4.2. Nhận định kết quả

- Đánh giá hình ảnh tế bào trên tiêu bản nhuộm đơn.
- Đánh giá hình ảnh vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm Gram.
- Soi dưới vật kính dầu (100x).
- Diễn giải và đọc kết quả:
 - + Vi khuẩn Gram (+) bắt màu tím gentian
 - + Vi khuẩn Gram (-) bắt màu đỏ fuchsin
 - + Vi hệ đường ruột bình thường khi có 70% trực khuẩn Gram âm và 30% liên cầu và các trực khuẩn Gram dương khác.
 - + Loạn khuẩn khi tỷ lệ các loại vi khuẩn trên thay đổi và/hoặc xuất hiện bào tử nấm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Gram dương giả: Tẩy còn chưa đủ thời gian.
- Gram âm giả:
 - + Tuổi của mẫu cấy vi khuẩn ảnh hưởng lên tính chất nhuộm Gram. Ở các mẫu cấy cũ, tế bào Gram dương thường trở thành Gram âm.
 - + Tẩy còn quá lâu và tráng không kỹ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

10. *Plasmodium* (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định tính

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện ký sinh trùng sốt rét trong máu bằng kỹ thuật nhuộm soi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nhận định ký sinh trùng sốt rét trong máu nhuộm Giemsa dựa trên hình thể, cấu tạo, kích thước và tính chất bắt màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Thuốc nhuộm Giemsa
- Dung dịch đệm
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Dầu soi kính
- Axit ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lam kính mài một đầu
- Ống đựng máu EDTA-K3 5ml
- Pipet nhựa tiết trùng
- Que lấy bệnh phẩm
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Bàn xét nghiệm
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chống đông.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Làm tiêu bản giọt máu đặc và giọt máu đàn để khô.
2	Cố định giọt máu đàn bằng cồn 96°.
3	Pha dung dịch Giemsa cốt với dung dịch đệm nồng độ 10%.

Các bước	Nội dung
4	Nhuộm lam với dung dịch Giemsa đã pha để 10 phút.
5	Rửa nước, để khô.
6	Quan sát kính hiển vi vật kính 100X.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Dương tính:

- Có 4 loài ký sinh trùng sốt rét gây bệnh cho người: Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale.
- Các thể gặp khi xét nghiệm máu
- Plasmodium falciparum: Thể tư dưỡng, thể giao bào ở máu ngoại vi, hiếm gặp thể phân liệt.
- Plasmodium vivax, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale: Cả 3 thể: thể tư dưỡng, thể phân liệt, thể giao bào ở máu ngoại vi.
- Đánh giá mức độ nhiễm KSTSR ở giọt máu đặc theo 4 mức độ:
 - + 1 - 10 KST / 100 vi trường: (+)
 - + 11 - 100 KST / 100 vi trường: (++)
 - + 1 - 10 KST / 1 vi trường: (+++)
 - + > 10 KST / 1 vi trường: (++++)

4.2.2. Âm tính

- Không tìm thấy ký sinh trùng sốt rét.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù kỹ thuật được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Giọt máu đặc bị bong sau khi nhuộm do lấy máu quá nhiều hoặc khi rửa dưới vòi nước chảy mạnh.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

11. *Plasmodium* (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định lượng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét có trong 1mm^3 máu trên tiêu bản nhuộm Giemsa.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét trong máu nhuộm Giemsa dựa trên hình thể, cấu tạo, kích thước và tính chất bắt màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Thuốc nhuộm Giemsa
- Dung dịch đệm
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Dầu soi kính
- Axit ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lam kính mài một đầu
- Ống đựng máu EDTA-K3 5ml
- Pipet nhựa tiết trùng
- Que lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Bàn xét nghiệm
- Đồng hồ bấm giờ
- Hai máy đếm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chống đông.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Làm tiêu bản giọt máu đặc và giọt máu dàn để khô.
2	Cố định giọt máu dàn bằng cồn 96°.
3	Pha dung dịch Giemsa cốt với dung dịch đệm nồng độ 10%.
4	Nhuộm lam với dung dịch Giemsa đã pha để 10 phút.
5	Rửa nước, để khô.
6	Quan sát kính hiển vi vật kính 100X.

4.2. Nhận định kết quả

- Xác định số lượng ký sinh trùng sốt rét trên 1mm³ máu theo bạch cầu (Dựa vào số lượng bạch cầu chuẩn 8.000 BC).
- Nếu đếm được 200 BC, số lượng KSTSR > 10, áp dụng công thức

$$\frac{\text{Số lượng KSTSR đếm được} \times 8000}{\text{Số lượng bạch cầu đếm được}} = \text{Số KSTSR/}\mu\text{l (*)}$$

- Nếu đếm được 200 BC, số lượng KSTSR < 10 thì tiếp tục đếm cho đủ 500 BC hoặc 1.000 BC rồi áp dụng công thức trên.
- Trường hợp mật độ KSTSR trên lam nhiều: Đếm chưa đủ 200 BC, số lượng KSTSR ≥ 500 thì không đếm tiếp mà áp dụng công thức trên.
- Cách trả lời kết quả xét nghiệm với kết quả đếm được (VD nhiễm P. falciparum thể tư dưỡng)

$$\text{KSTSR: P.F}_{\text{T}}^{+} = \text{Số lượng KST đếm được}/\mu\text{l.}$$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù kỹ thuật được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Giọt máu đặc bị bong sau khi nhuộm do lấy máu quá nhiều hoặc khi rửa dưới vòi nước chảy mạnh.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

12. Plasmodium (Ký sinh trùng sốt rét) Ag test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên ký sinh trùng sốt rét trong máu.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Nguyên lý: Kháng thể kháng ký sinh trùng sốt rét sẽ gắn đặc hiệu với kháng nguyên (ký sinh trùng sốt rét) có trong bệnh phẩm máu. Phản ứng xảy ra theo nguyên lý sắc ký miễn dịch.
- Định nghĩa:
 - + Vạch C (Control line): Vạch chứng
 - + Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.3. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- Đầu côn pipet
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C -8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chống đông.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Lấy thanh thử ra khỏi bao, để trên mặt phẳng khô sạch.
- Lấy 5µl máu đầu ngón tay bằng ống hút đến ngang vạch có sẵn hoặc máu tĩnh mạch cho vào giếng tròn S.
- Nhỏ 4 giọt buffer vào giếng vuông bên cạnh.
- Đọc kết quả sau 15 -30 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính:
 - + *P. falciparum* dương tính: có 2 vạch C và *P.f*
 - + *P. vivax* dương tính: có 2 vạch C và *P.v*
 - + Nhiễm phối hợp cả *P. falciparum* và *P.vivax*: có 3 vạch : vạch C, *P. f* và *P.v*
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

13. Vi khuẩn test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định nhanh sự có mặt của vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm thông qua phát hiện sự có mặt của kháng nguyên vi khuẩn bằng kỹ thuật test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng nguyên vi khuẩn dựa trên phản ứng kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên với kháng huyết thanh mẫu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.3. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Các loại bệnh phẩm chỉ định làm test nhanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Chuẩn bị bệnh phẩm xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Bóc thanh xét nghiệm và ghi mã số bệnh phẩm tương ứng.
- Thực hiện các bước tiếp theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Đọc kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi ô chứng dương và ô chứng âm đạt.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Kiểm tra chứng dương: có hiện tượng kết hợp kháng nguyên kháng thể đặc hiệu theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Kiểm tra chứng âm: không có có hiện tượng kết hợp kháng nguyên kháng thể đặc hiệu theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Đọc kết quả thử nghiệm theo hướng dẫn nhà sản xuất khi chứng dương và **chứng âm đạt yêu cầu.**

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Lượng bệnh phẩm đưa vào quá nhiều hoặc quá ít đều có thể ảnh hưởng đến kết quả.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

14. *Streptococcus pneumoniae* Ag test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch phát hiện kháng nguyên của *Streptococcus pneumoniae* trong dịch não tủy của người bệnh viêm màng não và nước tiểu của người bệnh viêm phổi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý bắt cặp đặc hiệu kháng nguyên – kháng thể của kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên *Streptococcus pneumoniae* trong bệnh phẩm (nếu có) sẽ gắn kết với kháng thể đơn dòng đặc hiệu được gắn trên màng Nitrocellulose kết hợp với cộng hợp vàng tạo phức hợp Kháng nguyên – Kháng thể và được hiển thị bằng vạch màu đặc trưng trên vùng tương ứng của dải giấy.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Sinh phẩm phát hiện kháng nguyên *Streptococcus pneumoniae* bao gồm: Khay thử nghiệm được bảo quản trong túi kín, có gói chất chống ẩm; Dung dịch pha loãng mẫu chứa trong lọ có nắp nhỏ giọt (sử dụng để pha loãng mẫu bệnh phẩm giải phóng kháng nguyên); Que tăm bông vô trùng; Mẫu chứng âm, chứng dương.
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch nước rửa tay
- Giá để ống
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học để thực hiện kỹ thuật

- Đồng hồ tính phút (đồng hồ bấm giây)
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định tại đơn vị
- Loại mẫu bệnh phẩm: Dịch não tủy, nước tiểu
- Tiêu chuẩn :
 - + Bệnh phẩm được lấy và bảo quản trong ống vô trùng theo hướng dẫn lấy mẫu của từng đơn vị.
 - + Vận chuyển mẫu đến khoa/ phòng vi sinh càng sớm càng tốt trong thời gian không quá 2 giờ kể từ khi lấy mẫu bệnh phẩm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 30 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước	Nội dung
1	Lấy khay thử nghiệm ra khỏi túi bảo quản và ghi thông tin mẫu bệnh phẩm lên phần quy định của khay thử
2	Sử dụng que tăm bông cung cấp sẵn trong hộp sinh phẩm, nhúng ngập hoàn toàn đầu tăm bông trong mẫu bệnh phẩm và ép nhẹ đầu tăm bông vào thành để loại bỏ dung dịch thừa.
3	Đưa tăm bông vào vị trí quy định cho mẫu trên khay thử nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
4	Đổ lọ chứa dung dịch pha loãng mẫu thẳng đứng, nhỏ từ từ 2 giọt vào vị trí quy định cho mẫu trên khay thử.
5	Cố định tấm bông mẫu trên khay thử theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
6	Đọc kết quả thử nghiệm trong khoảng thời gian quy định của nhà sản xuất.
7	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả của người bệnh được chấp nhận khi thực hiện kỹ thuật với mẫu chứng âm và chứng dương đều đạt yêu cầu:

- Chứng âm: chỉ có vạch xuất hiện tại vị trí C trên khay thử
- Chứng dương: có vạch xuất hiện tại vị trí C và T trên khay thử

4.2.2 Đọc kết quả và nhận định kết quả

- Chỉ có vạch xuất hiện tại vị trí C trên khay thử: Không có *Streptococcus pneumonia* Ag
- Có vạch xuất hiện tại vị trí C và T trên khay thử. Có *Streptococcus pneumonia* Ag
- Không có vạch xuất hiện tại các vị trí C và T của khay thử: xét nghiệm không có giá trị, tiến hành thực hiện lại với khay thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ của đơn vị

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	- Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Độ nhạy của kết quả giảm nếu sinh phẩm hóa chất không được thực hiện ở nhiệt độ quy định	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khuyến cáo hóa chất được đưa về

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn.	nhiệt độ phòng xét nghiệm trước khi sử dụng. - Thực hiện lại xét nghiệm với hóa chất sinh phẩm còn hạn sử dụng và đảm bảo chất lượng.
- Phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

15. *Clostridium difficile* độc tố A và B test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Tài liệu này hướng dẫn thực hiện quy trình xét nghiệm để phát hiện đồng thời kháng nguyên glutamate dehydrogenase *Clostridium difficile* và độc tố A và B trong một giếng phản ứng bằng kỹ thuật miễn dịch enzyme màng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng nguyên *Clostridium difficile* và độc tố A và B trong cùng một giếng phản ứng dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch enzyme màng.

Định nghĩa:

- C. difficile: *Clostridium difficile*
- DIL SPE (Diluent Specimen): Dung dịch pha loãng mẫu.
- MEM DEV (Membrane Device): Khay thử gắn màng
- WASH: Dung dịch rửa
- SUBS (Substrate): Chất nền
- CONJ (Conjugate): Cộng hợp

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh, bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm C. DIFF QUIK CHEK (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Dung môi pha mẫu
- Dung dịch rửa
- Chất nền
- Dung dịch cộng hợp
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay

- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Ống Eppendorf
- Que chuyên dùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Tăm bông vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-70°C)
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Đồng hồ bấm giờ
- Máy trộn lắc
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân sạch, mẫu phân được bảo quản đông hoặc mẫu phân trên các phương tiện vận chuyển (Cary Blair, C&S).

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm C. DIFF QUIK CHEK (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
PHA LOÃNG MẪU	
1	Cho tất cả chất thử và số lượng thiết bị cần thiết về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng. Việc loại bỏ bột khí được khuyến cáo để làm giảm thời gian cần thiết cho việc làm ấm đến nhiệt độ phòng.
2	Cài đặt vào giá và ghi nhãn cho ống thử với mỗi mẫu, và mẫu chứng tùy chọn theo yêu cầu.
3	Sử dụng ống nhỏ giọt có chia vạch, thêm 750 µl (vạch thứ 2 từ đầu) dung dịch pha loãng vào mỗi ống chứa mẫu phân. Với mẫu trên phương tiện vận chuyển như Cary Blair hay C&S, thêm 650 µl dung dịch pha loãng vào ống.
4	Thêm một giọt hợp chất cộng hợp vào mỗi ống (chai nắp đỏ)
5	Lấy một pipet chuyển bằng nhựa dùng một lần (được cung cấp cùng với kit thử) cho mỗi mẫu - các pipet được chia vạch đến 25 µl, 400 µl và 500 µl.
6	Trộn tất cả các mẫu kĩ càng bất chấp độ rắn của mẫu – việc mẫu được trộn đều trước khi được pha tiếp là vô cùng quan trọng. - Mẫu lỏng/ bán rắn: hút 25 µl mẫu với pipet chuyển và pha vào hỗn hợp cộng hợp và dung dịch pha loãng. Sử dụng cùng 1 pipet chuyển để trộn mẫu đã pha loãng.

Các bước	Nội dung
	- Mẫu rắn, định hình- cẩn thận khi cho một lượng chính xác phân định hình vào hỗn hợp mẫu. Trộn mẫu kĩ càng bằng que gỗ thích hợp và chuyển phần nhỏ của mẫu (đường kính gần 2 mm, thể tích khoảng 25 μl) vào hỗn hợp cộng hợp và dung dịch pha mẫu. Nhũ hóa mẫu, sử dụng que chuyên dụng. - Mẫu phân trên phương tiện vận chuyển Cary Blair hoặc C&S- dùng pipet lấy 100 μl mẫu (2 giọt pipet) cho vào hỗn hợp cộng hợp và dung dịch pha mẫu.
7	Mẫu chứng tùy chọn - <u>Mẫu chứng dương</u>- thêm một giọt chứng dương (chai nắp xám) vào hỗn hợp cộng hợp- dung dịch pha mẫu. - <u>Mẫu chứng âm</u>: thêm 25 μl dung dịch pha mẫu vào hỗn hợp cộng hợp- dung dịch pha mẫu. <i>CHÚ Ý: chuyển những mẫu quá nhỏ, hoặc trộn mẫu không thành và mẫu hoàn toàn lơ lửng trong hỗn hợp có thể dẫn đến kết quả dương tính giả. Thêm quá nhiều mẫu có thể dẫn đến kết quả không có giá trị do hạn chế dòng mẫu.</i>
TIẾN HÀNH XÉT NGHIỆM	
8	Để thanh thử gắn màng ra ngoài nhiệt độ phòng trước khi sử dụng, Chuẩn bị 1 thanh thử gắn màng cho mỗi mẫu, một thiết bị cho một chứng dương hoặc chứng âm. Dán nhãn mẫu vào thanh thử.
9	Đóng nắp từng ống chứa mẫu đã pha và trộn kĩ. Việc trộn có thể thực hiện bằng lắc hoặc đảo ống. Mẫu của bệnh nhân hoặc chứng dương đã được pha loãng trong hỗn hợp có thể được ủ ở nhiệt độ phòng theo thời gian bất kì lên đến 24 giờ trước khi đưa vào thanh thử gắn màng.
10	Sử dụng pipet chuyển mới, chuyển 500 μl hỗn hợp cộng hợp-dung dịch pha mẫu vào giếng mẫu của thanh thử, hãy chắc chắn đã cho hết mẫu lỏng vào màng bắc trong thiết bị.
11	Ủ thiết bị ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Thi thoảng, mẫu đã pha loãng không thấm được tốt và vùng phản ứng không ảm hết. Nếu vùng phản ứng không được thấm ướt toàn bộ trong 5 phút từ khi thêm mẫu vào. Thêm tiếp 100 μl (4 giọt) dung dịch pha mẫu vào giếng mẫu và đợi thêm 5 phút nữa (tổng cộng 20 phút).
12	Sau khi ủ, thêm 300 μl dung dịch đệm rửa vào vùng phản ứng, sử dụng ống nhỏ giọt chia vạch màu trắng. Để đệm rửa chảy qua màng vùng phản ứng và được thấm hoàn toàn.

Các bước	Nội dung
13	Thêm 2 giọt chất nền (chai nắp trắng) vào vùng phản ứng. Đọc kết quả bằng mắt và ghi lại sau 10 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm

- Kết quả có giá trị nếu như xuất hiện vạch đứt đoạn xanh hiện diện dưới “C” khi hết thời gian phản ứng
- Nếu điều kiện trên không đạt, thử nghiệm là không hợp lệ và phải được thực hiện lại.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Đọc kết quả và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả dương tính với kháng nguyên (“Ag”): Vạch “Ag” xanh và vạch đứt đoạn xanh dưới vùng “C” được nhìn thấy. Vạch này có thể nhạt hoặc đậm tùy cường độ. Vạch quan sát được một phần được cho là kết quả dương tính. Kết quả dương tính xác nhận sự có mặt của *C. difficile*.
- Kết quả dương tính với kháng nguyên và độc tố (“Tox”): nếu kết quả kháng nguyên dương tính (vạch “Ag” xanh và vạch đứt đoạn xanh dưới vùng “C” được nhìn thấy), tiến đến xác định kết quả với độc tố. kết quả dương tính với độc tố có thể được xác định khi vạch “Tox” xanh sẽ hiển thị. Vạch có thể nhạt đến đậm tùy cường độ. Vạch nhìn thấy một phần có thể được hiểu là kết quả dương tính. Kết quả dương tính xác nhận sự có mặt của độc tố *C. difficile*.
- Kết quả âm tính: Vạch đứt đoạn xanh được hiện diện ở giữa vùng phản ứng dưới “C” và không có vạch thử nào hiện diện tại vị trí “Ag” hay “Tox” của vùng phản ứng. Kết quả âm tính trong vùng kháng nguyên xác định không có kháng nguyên *C. difficile* trong mẫu hoặc ở mức dưới giới hạn phát hiện. Kết quả âm tính trong vùng độc tính xác định độc tính *C. difficile* không có mặt trong mẫu hoặc ở mức dưới giới hạn phát hiện của test thử.
- Âm tính với kháng nguyên (“Ag”), dương tính với độc tố (“Tox”): một tỉ lệ thấp các mẫu có thể cho kết quả âm tính với kháng nguyên nhưng dương tính với độc tố. Những mẫu này nên được cân nhắc và xét nghiệm lại bằng mẫu phân sạch. Nếu mẫu xét nghiệm lại vẫn âm tính với kháng nguyên nhưng dương tính với độc tố, báo cáo như kết quả dương tính với độc tố.
- Kết quả không có giá trị: không có vạch nào hiện diện ở vùng phản ứng (hình 1d). Kết quả không có giá trị nếu như vạch đứt đoạn xanh không hiện diện dưới “C” khi hết thời gian phản ứng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

16. *Legionella pneumophila* Ag test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch phát hiện kháng nguyên của *Legionella pneumophila* trong nước tiểu của người bệnh viêm phổi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý bắt cặp đặc hiệu kháng nguyên – kháng thể của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.
- Kháng nguyên *Legionella pneumophila* trong bệnh phẩm (nếu có) sẽ kết hợp với kháng thể đơn dòng đặc hiệu được gắn trên màng Nitrocellulose kết hợp với cộng hợp vàng tạo phức hợp Kháng nguyên - Kháng thể và được hiển thị bằng vạch màu đặc trưng trên vùng tương ứng của dải giấy.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Sinh phẩm phát hiện kháng nguyên *Legionella pneumophila* bao gồm: Khay thử nghiệm được bảo quản trong túi kín, có gói chất chống ẩm, Dung dịch pha loãng mẫu chứa trong lọ có nắp nhỏ giọt (sử dụng để pha loãng mẫu bệnh phẩm giải phóng kháng nguyên), Que tăm bông vô trùng, Mẫu chứng âm, chứng dương
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch nước rửa tay
- Vật tư tiêu hao, vật tư thay thế
- Vật tư tiêu hao
- Vật tư thay thế
- Giá để ống
- Vật tư thay thế khác
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học để thực hiện kỹ thuật
- Đồng hồ tính phút (đồng hồ bấm giây)
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định tại đơn vị
- Loại mẫu bệnh phẩm: Nước tiểu
- Tiêu chuẩn :
 - + Bệnh phẩm được lấy và bảo quản trong ống vô trùng theo hướng dẫn lấy mẫu của từng đơn vị.
 - + Vận chuyển mẫu đến khoa/ phòng vi sinh càng sớm càng tốt trong thời gian không quá 2 giờ kể từ khi lấy mẫu bệnh phẩm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm Vi sinh/ Phòng xét nghiệm Vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước	Nội dung
1	Lấy khay thử nghiệm ra khỏi túi bảo quản và ghi thông tin mẫu bệnh phẩm lên phần quy định của khay thử
2	Sử dụng que tăm bông cung cấp sẵn trong hộp sinh phẩm, nhúng ngập hoàn toàn đầu tăm bông trong mẫu bệnh phẩm và ép nhẹ đầu tăm bông vào thành để loại bỏ dung dịch thừa.

Các bước	Nội dung
3	Đưa tấm bông vào vị trí quy định cho mẫu trên khay thử nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Đổ lọ chứa dung dịch pha loãng mẫu thẳng đứng, nhỏ từ từ 2 giọt vào vị trí quy định cho mẫu trên khay thử.
5	Cố định tấm bông mẫu trên khay thử theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
6	Đọc kết quả thử nghiệm trong khoảng thời gian quy định của nhà sản xuất.
7	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả của người bệnh được chấp nhận khi thực hiện kỹ thuật với mẫu chứng âm và chứng dương đều đạt yêu cầu:

- Chứng âm: chỉ có vạch xuất hiện tại vị trí C trên khay thử
- Chứng dương: có vạch xuất hiện tại vị trí C và T trên khay thử

4.2.2 Đọc kết quả và nhận định kết quả

- Chỉ có vạch xuất hiện tại vị trí C trên khay thử: Không có *Legionella pneumophila* Ag
- Có vạch xuất hiện tại vị trí C và T trên khay thử: Có *Legionella pneumophila* Ag
- Không có vạch xuất hiện tại vị trí C của khay thử: xét nghiệm không có giá trị, tiến hành thực hiện lại với khay thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ của đơn vị

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	- Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Độ nhạy của kết quả giảm nếu sinh phẩm hóa chất không được thực hiện ở nhiệt độ quy định. - Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn.	xuất. Khuyến cáo hóa chất được đưa về nhiệt độ phòng xét nghiệm trước khi sử dụng. - Thực hiện lại xét nghiệm với hóa chất sinh phẩm còn hạn sử dụng và đảm bảo chất lượng.
- Phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

17. *Rickettsia* Ab test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm phát hiện định tính các kháng thể IgM, IgG hoặc IgA kháng *Orientia tsutsugamushi* trong huyết thanh, huyết tương hay máu toàn phần bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể IgM, IgG, IgA kháng *Orientia tsutsugamushi* (nếu có) kết hợp với kháng nguyên có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng nguyên tái tổ hợp đặc hiệu, tạo thành phức hợp miễn dịch làm đổi màu tại vạch thử test T tại vùng phản ứng.

Định nghĩa: Rickettsia Ab: kháng thể IgM/IgG/IgA kháng *Orientia tsutsugamushi*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Tsutsugamushi*. (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu tip 100 µl
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- Bơm kim tiêm vô trùng 10ml
- Bông tiêm vô trùng
- Panh

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl
- Đồng hồ bấm giây

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu huyết thanh, huyết tương hay máu toàn phần.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Cơ sở khám bệnh chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Tsutsugamushi*. (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề sinh phẩm cân bằng nhiệt độ phòng khoảng 30 phút. Đánh số, viết sơ đồ và sắp xếp bệnh phẩm theo thứ tự.
2	Lấy thanh thử ra khỏi túi đựng và đặt lên bề mặt khô, phẳng.
3	Dùng Pipet nhựa có sẵn trong bộ sinh phẩm hút mẫu rồi nhỏ 10 μ l huyết thanh, huyết tương hoặc 20 μ l mẫu máu toàn phần vào giếng mẫu (S) và nhỏ tiếp 3 – 4 giọt (100 -120 μ l) dung môi pha loãng.
4	Đọc kết quả ở thời điểm 10 - 15 phút. Nếu thấy xuất hiện vệt mờ ở phút 20, đọc lại kết quả ở phút 30.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào sổ hoặc file mềm. Có thể in ra kết quả đã nhập vào phần mềm quản lý xét nghiệm.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi tại vùng kiểm chứng có vạch màu. Nếu vạch chứng không xuất hiện sau khi thử nghiệm, kết quả này không có giá trị và phải làm lại.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- + Dương tính: Xuất hiện vạch ở cả vùng chứng (C) và vùng đọc kết quả bệnh nhân (T).
- + Âm tính (Một vạch): Chỉ xuất hiện vạch ở vùng chứng (C) và không xuất hiện vạch T ở vùng đọc kết quả bệnh nhân .
- + Kết quả không có giá trị: Không xuất hiện vạch tại vùng chứng, có thể do lượng mẫu xét nghiệm không đủ hoặc kỹ thuật thực hiện sai. Cần phải làm lại xét nghiệm trên thanh thử mới.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Khuyến cáo kiểm tra lại kết quả nghi ngờ bằng cách xét nghiệm mẫu thử hoặc lấy mẫu mới xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

18. *Salmonella* Ag test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên của vi khuẩn *Salmonella* có trong mẫu bệnh phẩm huyết thanh/mẫu phân của người bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Kháng nguyên của *Salmonella* có trong mẫu bệnh phẩm khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, sự xuất hiện của kháng nguyên vi khuẩn *Salmonella* thể hiện kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa:

- + Vạch C (Control line): Vạch chứng
- + Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 2.5 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín hoặc huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để thanh thử, mẫu phân, mẫu huyết thanh vào dung môi pha loãng về nhiệt độ phòng.
- Dùng que lấy mẫu ở 4 vị trí khác nhau của mẫu phân, để thu đủ lượng mẫu yêu cầu, đưa mẫu vào ống test đã có sẵn dung môi pha loãng. Đối với mẫu phân lỏng, dùng

pipet nhỏ lượng mẫu yêu cầu vào ống test. Đóng nắp ống test. Lắc đều ống để đảm bảo mẫu được đồng nhất tốt. Nhỏ 4 giọt dung dịch đã trộn vào giếng mẫu được đánh dấu chữ S trên thanh thử. Tránh nhỏ cận phân vào giếng.

- Với mẫu huyết thanh: Nhỏ 1 giọt huyết thanh vào giếng trên test và nhỏ thêm 3 giọt dung môi vào vị trí (S).
- Đọc kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể gặp khi:
- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Cận phân che giếng S, khuấy mẫu đã nhỏ ở giếng (S) bằng que. Nếu xét nghiệm vẫn không thực hiện được, nhỏ thêm 1 giọt dung môi cho đến khi nhìn thấy dung dịch lỏng di chuyển đến vùng phản ứng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.

19. *Salmonella* Ab test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG/IgM của vi khuẩn *Salmonella* có trong mẫu bệnh phẩm huyết thanh/huyết tương của người bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Nguyên lý:** Kháng thể của vi khuẩn *Salmonella* có trong mẫu bệnh phẩm sẽ kết dính vào cộng hợp kháng nguyên *Salmonella* tại vùng cộng hợp, tạo thành phức hợp miễn dịch. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, sự có mặt của vi khuẩn *Salmonella* được xác định bằng kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.
- **Định nghĩa**
 - + Vạch C (Control line): Vạch chứng
 - + Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư tiêu hao, vật tư thay thế
- Vật tư tiêu hao
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- Vật tư thay thế
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây

- Panh
- Vật tư thay thế khác
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 2.5 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh/huyết tương
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để thanh thử, mẫu huyết thanh vào dung môi pha loãng về nhiệt độ phòng.
- Nhỏ 10µl huyết thanh/huyết tương hoặc 20µl máu toàn phần vào vị trí S trên thanh test. Nhỏ 3 - 4 giọt dung môi vào giếng (S).
- Đọc kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Dương tính IgM: Xuất hiện bằng xét nghiệm vạch IgM (Vạch 1) và băng đối chứng (C). Kết quả này chỉ rằng tình trạng nhiễm Salmonella typhi nguyên phát
- Dương tính IgG: Xuất hiện bằng xét nghiệm IgG (Vạch 2) và băng đối chứng (C). Kết quả này chỉ ra sự nhiễm Salmonella typhi thứ cấp hay có nhiễm trước đó
- Dương tính với IgM và IgG: Xuất hiện 3 băng xét nghiệm IgM (T1), IgG (T2) và băng đối chứng (C). Kết quả này chỉ ra sự nhiễm Salmonella typhi nguyên phát muộn hay thứ phát sớm
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm.
- Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Tính ổn định của hóa chất xét nghiệm có thể bị ảnh hưởng bởi độ ẩm, do đó nên thực hiện xét nghiệm ngay sau khi mở test

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

20. *Treponema pallidum* test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định kháng thể đặc hiệu kháng xoắn khuẩn *Treponema pallidum* trong mẫu máu người bệnh bằng test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Mẫu thử (huyết thanh, huyết tương hoặc toàn máu) được nhỏ lên vùng nạp mẫu của test nhanh. Nếu mẫu chứa kháng thể kháng *Treponema pallidum*, chúng sẽ liên kết với kháng nguyên *Treponema pallidum* được gắn chất tạo màu tại vùng cộng hợp, tạo thành phức hợp miễn dịch. Phức hợp này di chuyển dọc theo màng sắc ký nhờ hiện tượng mao dẫn và bị giữ lại tại vạch phản ứng nhờ kháng nguyên hoặc kháng thể bất cặp đặc hiệu, tạo thành vạch màu có thể quan sát bằng mắt thường. Sự xuất hiện của vạch này cho thấy kết quả dương tính.

Định nghĩa:

- + Vạch C (Control line): Vạch chứng
- + Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.3. Thiết bị y tế

- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Loại bệnh phẩm: Có thể sử dụng huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần

- Máu toàn phần có thể lấy máu đầu ngón tay bằng ống mao quản có chất chống đông
- Huyết tương được lấy từ các ống máu có chống đông Heparin sau ly tâm
- Huyết thanh được lấy từ các ống máu không chứa chất chống đông
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Để thanh thử và dung môi pha loãng về nhiệt độ phòng.
- Ly tâm mẫu máu 3500 vòng/phút, 10 phút
- Đánh số thứ tự hoặc ghi tên tuổi bệnh nhân trên thanh thử nghiệm
- Đặt test kit trên mặt phẳng khô ráo
- Nhỏ 40uL huyết thanh hoặc huyết tương vào giếng thử (80uL nếu dùng máu toàn phần)
- Nhỏ 1 giọt dung môi (tương đương 40uL) cũng vào giếng thử
- Bấm đồng hồ đo thời gian và đọc kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C:

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể gặp khi: Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

21. Virus test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên hoặc kháng thể của một số loại virus từ bệnh phẩm bằng kỹ thuật test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa:

- + Vạch C (Control line): Vạch chứng
- + Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.3. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Ly tâm ống bệnh phẩm.
- Bóc thanh xét nghiệm và ghi mã số bệnh phẩm tương ứng.
- Thực hiện các bước tiếp theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Đọc kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Đọc kết quả tại thời điểm sớm hơn hoặc muộn hơn thời gian quy định có thể làm sai lệch kết quả.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

22. Chikungunya test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính các kháng thể IgM/IgG kháng *Chikungunya* virus trong huyết thanh, huyết tương hay máu toàn phần bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng nguyên tái tổ hợp có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Chikungunya IgM/IgG FIA. (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 200 µl
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch tỵ hầu và ngoáy mũi/họng ở người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Cơ sở khám bệnh chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất được ví dụ ở trên.

Các bước	Nội dung
1	Đề sinh phẩm cân bằng nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện xét nghiệm. Đánh số, viết sơ đồ và sắp xếp bệnh phẩm theo thứ tự.
2	Kiểm tra hạn sử dụng, lấy thanh thử ra khỏi túi đựng và đặt lên bề mặt khô, phẳng. Kiểm tra trên thanh thử có vạch màu tím.
3	Chuẩn bị máy phân tích xét nghiệm theo hướng dẫn chọn theo cách thức xét nghiệm theo tiêu chuẩn “Standard test” vào màn hình “Workplace” và “Run test”. Dùng Pipet nhựa có sẵn trong bộ sinh phẩm hút mẫu rồi nhỏ 10 µl huy.
4	Cho test vào vị trí trên máy phân tích để kiểm tra mã vạch, cho phép thanh thử có thể thực hiện được xét nghiệm.
5	Nhỏ 10 µl huyết thanh/huyết tương hoặc dùng pipet nhựa có sẵn trong bộ sinh phẩm hút đến vạch đen 10 µl máu toàn phần nhỏ vào giếng nhỏ mẫu trên thanh thử.
6	Nhỏ 3 giọt dung dịch pha loãng vào giếng nhỏ pha loãng trên thanh thử.
7	Ấn vào nút OK/START/ Test Start tùy theo máy phân tích F100/F200/F400.
8	Máy sẽ phân tích và trả kết quả trong vòng 15 phút.
Có thể thực hiện xét nghiệm theo cách thức chỉ đọc kết quả trên máy READ ONLY: - Thực hiện các bước 1,2,4,5,6 sau đó ủ bên ngoài 15 phút (không để quá 20 phút). - Chuẩn bị máy phân tích và chọn chế độ READ ONLY theo hướng dẫn. - Cho thanh thử vào máy để phân tích kết quả.	

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Khi kiểm tra test, màn hình hiển thị Invalid Device, kết quả phân tích không cho giá trị COI cần thực hiện lại xét nghiệm

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

23. Adenovirus test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên của Adenovirus trong phân người bằng phương pháp sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng nguyên của Adenovirus nhóm A dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ kit làm xét nghiệm
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm vô trùng
- Bông tiêm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)

- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ 5 µl đến 100 µl

2.4. Mẫu bệnh phẩm:

- Loại bệnh phẩm: Phân
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng từ 30 -60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến trình kỹ thuật: Bộ sinh phẩm test nhanh Adenovirus (hoặc sinh phẩm tương đương)

- Để mẫu, test thử và dung dịch pha loãng mẫu về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm từ (15-20 phút).
- Chuẩn bị test, ghi tên bệnh nhân hoặc mã số trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Hút dung dịch pha loãng mẫu theo hướng dẫn.
- Lấy khoảng 50 mg phân bằng que tăm bông vô trùng nhúng vào ống nghiệm có chứa dung dịch pha loãng.
- Xoay tròn que tăm bông để bệnh phẩm hòa vào dung dịch pha loãng theo hướng dẫn.
- Đậy nắp ống nghiệm đã có bệnh phẩm lại.

- Nhỏ 3-4 giọt dung dịch bệnh phẩm đã pha loãng vào giếng nhỏ bệnh phẩm (có chữ S).
- Đọc kết quả sau 10-20 phút.

4.2. Nhận định kết quả

- Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ tía hoặc chỉ có 1 vạch.
 - + C là vạch chứng (Control line)
 - + T là vạch thử nghiệm (Test line)
- Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C (Control).

4.2. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả như bảng sau:

Hiện tượng	Kết quả
Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ	Dương tính
Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (vạch chứng C)	Âm tính
Trên thanh thử không xuất hiện vạch C	Test hỏng

Lưu ý: Nếu test không xuất hiện vạch chứng thì test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm

- Dựa vào bảng đọc kết quả thực hiện trả kết quả:
 - + Dương tính
 - + Âm tính
- Sau đó nhập kết quả vào phần mềm, in kết quả trả cho lâm sàng.
- Lưu kết quả lại vào hồ sơ lưu theo qui định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn $\Rightarrow$ Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng. Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Không đọc kết quả sau 20 phút.

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT).
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

24. RSV test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính vi rút hợp bào hô hấp (RSV) từ bệnh phẩm trong vòm mũi họng bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng nguyên của virus hợp bào hô hấp (RSV) dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

Định nghĩa: RSV: Respiratory Syncytial Virus- Virus hợp bào hô hấp

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm RSV (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Dung dịch đệm chiết
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiết trùng
- Ống Eppendorf
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Dụng cụ hút dịch tỵ hầu
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Dụng cụ lấy mẫu theo hướng dẫn ở sổ tay lấy mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-70 °C)
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Đồng hồ bấm giờ
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 µl, 200 µl và 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch tỵ hầu, dịch hút lấy từ vòm mũi, họng .
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định .

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Cơ sở khám bệnh chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm RSV (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đưa dụng cụ xét nghiệm và mẫu thử về nhiệt độ 15~30°C trước khi xét nghiệm

Các bước	Nội dung
2	Nhỏ 200-250 µl dung dịch đệm chiết vào ống nghiệm rộng.
3	Nhỏ 200-250 µl mẫu vào ống nghiệm trên, thu được tỷ lệ pha loãng 1/2 (1v: 1v),
4	Trộn đều, cẩn thận để đồng nhất dung dịch và đặt cố định 10 phút ở nhiệt độ phòng.
5	Đặt thanh thử vào ống nghiệm theo chiều mũi tên hướng xuống dưới. Không cầm hoặc di chuyển que thử đến khi thử nghiệm hoàn thành và đọc kết quả.
6	Đọc kết quả trong 15 phút. Không đọc kết quả sau 15 phút.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C (Control).

- Xem xét kết quả QC:

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*

Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*

NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC

Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- Kết quả âm tính: Chỉ một vạch chứng (vạch “C”) xuất hiện
- Kết quả dương tính: Xuất hiện cả vạch chứng và vạch thử
- Kết quả không có giá trị: Vạch chứng (vạch “C”) không xuất hiện
- Nếu vạch màu tím hồng không nhìn thấy trong cửa sổ đọc kết quả hoặc chỉ xuất hiện vạch thử sau khi thực hiện xét nghiệm, kết quả không có giá trị.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyề
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

25. *Cryptosporidium* test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định định tính *Cryptosporidium* có trong mẫu bệnh phẩm phân của người bằng kỹ thuật test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý : Phát hiện kháng nguyên của *Cryptosporidium* từ mẫu phân bằng phương pháp sắc ký miễn dịch.

Định nghĩa

- + Vạch C (Control line): Vạch chứng
- + Vạch CRYP: Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Đưa thanh thử để ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- Mẫu phân tươi nên được pha loãng 1: 4 (0,1 ml mẫu và 0,3 ml nước cất) trước khi thử nghiệm.
- Dán nhãn ống và thêm 4 giọt dung dịch đệm pha loãng mẫu vào ống.
- Dùng pipet chuyển 0.1 ml mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào ống, trộn đều.

- Thêm 4 giọt Conjugate vào ống, trộn đều.
- Dùng pipet chuyên 0,2 ml của mẫu đã pha loãng vào giếng tròn của thanh thử. Đọc kết quả xét nghiệm sau 15 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và một vạch màu đỏ tại CRYP (Một vạch màu hồng được xác định kết quả dương tính).
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Cặn phân che giếng S, khuấy mẫu đã nhỏ ở giếng (S) bằng que. Nếu xét nghiệm vẫn không thực hiện được, nhỏ thêm 1 giọt dung môi cho đến khi nhìn thấy dung dịch lỏng di chuyển đến vùng phản ứng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

26. Vi nấm test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện vi nấm trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Phát hiện kháng nguyên vi nấm qua phản ứng kết hợp đặc hiệu của kháng nguyên và kháng thể tương ứng.

Định nghĩa:

- + Vạch C (Control line): Vạch chứng
- + Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Trang thiết bị

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch não tủy, huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để thanh thử, mẫu bệnh phẩm và dung môi pha loãng về nhiệt độ phòng.
- Ly tâm ống bệnh phẩm (nếu bệnh phẩm là máu).
- Nhỏ dung dịch pha loãng vào tube sạch.
- Nhỏ bệnh phẩm vào tube có dung dịch pha loãng, ghi mã bệnh phẩm tương ứng.
- Cắm thanh xét nghiệm vào tube, đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Cho quá ít bệnh phẩm hoặc quá nhiều dung dịch pha loãng có thể ảnh hưởng đến nhận định kết quả.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

27. *Aspergillus* Ag test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên *Aspergillus* trong mẫu huyết thanh ở người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng nguyên tái tổ hợp có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán *Aspergillus* Antibody Test
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Micropipette 50 μ , 100 μ
- Đầu côn 50 μ 100 μ , 200 μ
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Pipet vi lượng 50 µl đến 200 µl

2.3. Mẫu bệnh phẩm:

- Loại bệnh phẩm: Mẫu huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 30 – 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến trình kỹ thuật: Bộ sinh phẩm, bộ kit phát hiện *Aspergillus* (Xét nghiệm dòng bên) (hoặc sinh phẩm tương đương). Theo quy trình của nhà sản xuất. Ví dụ:

- Để mẫu, test thử và dung dịch pha loãng mẫu về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm từ (15-20 phút).
- Chuẩn bị test, ghi tên bệnh nhân hoặc mã số trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Tiến hành pha loãng mẫu 1/10 (10µl huyết thanh + 90µl dung dịch pha loãng mẫu).

- Chuẩn bị test, ghi tên bệnh nhân hoặc mã số trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Cho 50µl dung dịch mẫu đã pha loãng vào giếng S.
- Đọc kết quả trong vòng 10 phút.

4.2. Nhận định kết quả

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ tía hoặc chỉ có 1 vạch.

- C là vạch chứng (Control line)
- T là vạch thử nghiệm (Test line)

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi tại vùng kiểm chứng có vạch màu xanh. Nếu vạch chứng không xuất hiện sau khi thử nghiệm, kết quả này không có giá trị và phải làm lại.

4.3 . Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả như bảng sau:

Hiện tượng	Kết quả
Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ	Dương tính
Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (vạch chứng C)	Âm tính
Trên thanh thử không xuất hiện vạch C	Test hỏng

Lưu ý: Nếu test không xuất hiện vạch chứng, test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm

- Dựa vào bảng đọc kết quả thực hiện trả kết quả:
 - + Dương tính
 - + Âm tính
- Sau đó nhập kết quả vào phần mềm, in kết quả trả cho lâm sàng.
- Lưu kết quả lại vào hồ sơ lưu theo qui định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

28. *Aspergillus* Ab test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể IgG/IgM kháng *Aspergillus* có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng nguyên tái tổ hợp có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa:

- + Vạch C : Control line
- + Vạch T : Test line

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán *Aspergillus* Antibody Test
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu cân 200 µl vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khẩn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước	Xét nghiệm định tính <i>Aspergillus</i> IgM/IgG
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 15 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Ghi thông tin và mã bệnh phẩm lên thanh thử
3	Dùng micropipette hút 15µl huyết thanh hoặc huyết tương nhỏ vào giếng bệnh phẩm. Chờ cho bệnh phẩm thấm hút hết vào thanh thử.
4	Giữ cho lọ buffer thẳng đứng, nhỏ 4 giọt buffer vào giếng. Bắt đầu tính thời gian thực hiện kỹ thuật.
5	Đọc kết quả sau 20 phút - 30 phút <i>Lưu ý: Mọi kết quả đọc sau quá 30 phút đều không có giá trị và phải thử nghiệm lại.</i>

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào sổ hoặc file mềm. Có thể in ra kết quả đã nhập vào phần mềm quản lý xét nghiệm.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi tại vùng kiểm chứng có vạch màu xanh. Nếu vạch chứng không xuất hiện sau khi thử nghiệm, kết quả này không có giá trị và phải làm lại.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Dương tính: Xuất hiện 2 vạch: vạch đen (T) và vạch xanh (C). Bất kỳ vạch (T) nào thấy được ở vùng đọc kết quả bệnh nhân đều được đọc kết quả là dương tính.
- Âm tính (Một vạch): Chỉ xuất hiện vạch xanh ở vùng chứng (C) và không xuất hiện vạch đen ở vùng đọc kết quả bệnh nhân .
- Kết quả không có giá trị: Không xuất hiện vạch tại vùng chứng, có thể do lượng mẫu xét nghiệm không đủ hoặc kỹ thuật thực hiện sai. Cần phải làm lại xét nghiệm trên thanh thử mới.

4.2.3. Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Khuyến cáo kiểm tra lại kết quả nghi ngờ bằng cách xét nghiệm mẫu thử hoặc lấy mẫu mới xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber; CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

29. *Entamoeba histolytica* test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định kháng nguyên của *Entamoeba histolytica* trong mẫu bệnh phẩm phân của người bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa:

- Vạch C (Control line): Vạch chứng
- Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật : Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để thanh thử, mẫu phân vào dung môi pha loãng về nhiệt độ phòng.
- Dùng que lấy mẫu ở 4 vị trí khác nhau của mẫu phân, để thu đủ lượng mẫu yêu cầu, đưa mẫu vào ống test đã có sẵn dung môi pha loãng. Đối với mẫu phân lỏng, dùng pipet nhỏ lượng mẫu yêu cầu vào ống test.
- Đóng nắp ống test. Lắc đều ống để đảm bảo mẫu được đồng nhất tốt.
- Nhỏ 4 giọt dung dịch đã trộn vào giếng mẫu được đánh dấu chữ S trên thanh thử. Tránh nhỏ cận phân vào giếng.

- Đọc kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Cặn phân che giếng S, khuấy mẫu đã nhỏ ở giếng (S) bằng que. Nếu xét nghiệm vẫn không thực hiện được, nhỏ thêm 1 giọt dung môi cho đến khi nhìn thấy dung dịch lỏng di chuyển đến vùng phản ứng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

30. *Giardia lamblia* test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định kháng nguyên của *Giardia lamblia* trong mẫu bệnh phẩm phân của người bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa:

- Vạch C (Control line): Vạch chứng
- Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật viên y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để thanh thử, mẫu phân vào dung môi pha loãng về nhiệt độ phòng.
- Dùng que lấy mẫu ở 4 vị trí khác nhau của mẫu phân, để thu đủ lượng mẫu yêu cầu, đưa mẫu vào ống test đã có sẵn dung môi pha loãng. Đối với mẫu phân lỏng, dùng pipet nhỏ lượng mẫu yêu cầu vào ống test.
- Đóng nắp ống test. Lắc đều ống để đảm bảo mẫu được đồng nhất tốt.
- Nhỏ 4 giọt dung dịch đã trộn vào giếng mẫu được đánh dấu chữ S trên thanh thử. Tránh nhỏ cận phân vào giếng.
- Đọc kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- + Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- + Cận phân che giếng S, khuấy mẫu đã nhỏ ở giếng (S) bằng que. Nếu xét nghiệm vẫn không thực hiện được, nhỏ thêm 1 giọt dung môi cho đến khi nhìn thấy dung dịch lỏng di chuyển đến vùng phản ứng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

31. Ký sinh trùng test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định kháng nguyên hoặc kháng thể của ký sinh trùng trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên hoặc kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng kháng thể hoặc kháng nguyên tái tổ hợp có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể hoặc kháng nguyên tái tổ hợp đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa:

- + Vạch C (Control line): Vạch chứng
- + Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Trang thiết bị

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám bệnh chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để thanh thử, mẫu phân và dung môi pha loãng về nhiệt độ phòng.

- Dùng que lấy mẫu ở 4 vị trí khác nhau của mẫu phân, để thu đủ lượng mẫu yêu cầu, đưa mẫu vào ống test đã có sẵn dung môi pha loãng. Đối với mẫu phân lỏng, dùng pipet nhỏ lượng mẫu yêu cầu vào ống test.
- Đóng nắp ống test. Lắc đều ống để đảm bảo mẫu được đồng nhất tốt.
- Nhỏ một lượng (theo hướng dẫn của nhà sản xuất) dung dịch chứa bệnh phẩm đã trộn vào giếng mẫu được đánh dấu chữ S trên thanh thử. Tránh nhỏ cận phân vào giếng.
- Đọc kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Cận phân che giếng S, khuấy mẫu đã nhỏ ở giếng (S) bằng que. Nếu xét nghiệm vẫn không thực hiện được, nhỏ thêm 1 giọt dung môi cho đến khi nhìn thấy dung dịch lỏng di chuyển đến vùng phản ứng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

32. Vi khuẩn nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nuôi cấy, phân lập và định danh vi khuẩn gây bệnh bằng phương pháp nuôi cấy.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học, có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường nuôi cấy
- Môi trường cấy chuyển chủng
- Canh thang BHI glycerol 20%
- Canh thang BHI
- Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Oxidase
- Indole
- Dung dịch H₂O₂
- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Nước cất
- Dầu soi kính
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*

- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que gồ xử lý bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đầu tip loại 1000 μ l
- Đầu tip loại 1 μ l
- Lam kính
- Vật tư cần thiết định danh theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Que cấy nhựa
- Tăm tre
- Tube Eppendorf
- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Chủng chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại

Ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng

- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH

- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Tất cả các loại bệnh phẩm được chỉ định nuôi cấy tìm vi khuẩn gây bệnh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 72-96 giờ (3 - 4 ngày) có thể lâu hơn cho những loài vi khuẩn mọc chậm. Riêng cấy máu trả trong 120 giờ (5 ngày) tính từ lúc nhận bệnh phẩm.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập phù hợp với từng loại bệnh phẩm.
- Ủ trong tủ ấm 35-37°C, điều kiện khí trường phù hợp cho từng loại bệnh phẩm, từng loài vi khuẩn.
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ, nhuộm soi, thử nghiệm các thử nghiệm sinh vật hoá học đơn giản.

- Định danh bằng bộ thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học cho từng loại vi khuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không có vi khuẩn mọc hoặc không phân lập được vi khuẩn gây bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.
- Nếu có yêu cầu tìm căn nguyên vi khuẩn hiếm gặp, phải ghi yêu cầu cụ thể.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

33. Vi nấm nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nuôi cấy, phân lập và định danh vi nấm gây bệnh bằng kỹ thuật nuôi cấy.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nuôi cấy, định danh vi nấm dựa trên các tính chất về hình thể, cấu tạo, bắt màu và một số tính chất sinh vật, hóa học của nấm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường Sabouraud
- Môi trường Candiselect
- Lactophenol Coton Blue
- Nước muối sinh lý
- KOH 20 %
- Mực tàu
- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Dầu soi kính
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đầu tip loại 1000µl
- Đầu tip loại 1µl
- Lam kính

- Vật tư cần thiết định danh theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Que cấy nhựa
- Tăm tre
- Tube Eppendorf
- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Chủng chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C

- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu, dịch, mủ, đờm, phân, nước tiểu, da, tóc, móng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 168 – 240 giờ (7 - 10 ngày) có thể lâu hơn cho các loài vi nấm mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Nuôi cấy nấm trên môi trường Sabouraud, ủ ấm ở nhiệt độ 30°C và/hoặc 37°C, khí trường thường.

- Bệnh phẩm là da, tóc, móng: Cắt nhỏ bệnh phẩm cấy 6- 8 điểm trên đĩa Sabouraud.
- Bệnh phẩm là các chất dịch: Hút 3- 5 giọt dịch cấy dàn trên đĩa Sabouraud.
- Bệnh phẩm là nước tiểu: Sử dụng kỹ thuật cấy định lượng.

Bắt khuẩn lạc nghi ngờ, quan sát đặc điểm khuẩn lạc, bào tử (nếu có), nhuộm soi khuẩn lạc, nhuộm soi bào tử (nếu có).

Định danh bằng bộ thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học cho từng loại vi khuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi nấm gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.

- Âm tính: Không có vi khuẩn mọc hoặc không phân lập được vi nấm gây bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Lấy quá ít bệnh phẩm có thể gây âm tính giả.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

34. Vi khuẩn nuôi cấy và định danh hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nuôi cấy, phân lập và định danh vi khuẩn gây bệnh trên hệ thống tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Chai cấy máu/dịch vô trùng được theo dõi hàng ngày trong hệ thống máy cấy máu tự động. Máy cấy máu tự động ủ và lắc liên tục. Đèn huỳnh quang trong máy quét 10 phút/lần vào lớp màng ở đáy chai để phát hiện nồng độ CO₂. Nếu có sự phát triển của vi khuẩn, CO₂ sẽ được giải phóng ra môi trường, hệ thống máy cấy máu sẽ phát hiện và báo kết quả dương tính.

Các bệnh phẩm khác được nuôi cấy thông thường nhưng khi mẫu cấy dương tính và chai cấy máu báo dương sẽ được định danh bằng hệ thống tự động dựa trên tính chất sinh vật hóa học của vi khuẩn hoặc bằng phương pháp khối phổ dựa trên tính chất của protein vi khuẩn.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Chai cấy máu
- Môi trường nuôi cấy
- Môi trường cấy chuyển chủng
- Canh thang BHI glycerol 20%
- Canh thang BHI
- Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Oxidase
- Urease
- Dung dịch H₂O₂
- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Nước muối 0.45%

- Dầu soi kính
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đầu tip các loại
- Lam kính
- Vật tư cần thiết định danh theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Que cấy nhựa
- Tăm tre
- Tube Eppendorf
- Ống tube định danh 5ml
- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Chủng chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại

- Ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng
- Tủ ẩm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống cấy máu tự động
- Hệ thống định danh tự động
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 200 µl đến 1000 µl
- Cassette có dán mã

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu, dịch vô trùng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm 48-72 giờ (2 - 3 ngày) có thể lâu hơn cho những loài vi khuẩn mọc chậm. Riêng cấy máu trả trong 120 giờ (5 ngày) tính từ lúc nhận bệnh phẩm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Cây máu

- Đưa chai cấy máu vào máy cấy máu tự động.
- Lấy chai cấy máu ra ngoài
- Nếu máy báo chai cấy máu dương tính:
 - + Nhuộm soi đánh giá kết quả sơ bộ.
 - + Cấy chuyển bệnh phẩm ra môi trường đĩa.
 - + Ủ trong tủ ấm 35°C khí trường 5% CO₂.
 - + Bắt khuẩn lạc nghi ngờ, nhuộm soi, thử nghiệm các thử nghiệm sinh vật hoá học đơn giản.
 - + Định danh bằng phương pháp khối phổ/hoặc phương pháp sinh vật hóa học trên hệ thống tự động theo hướng dẫn của nhà sản xuất hệ thống định danh sử dụng.

4.1.2. Các bệnh phẩm khác

- Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập phù hợp với từng loại bệnh phẩm.
- Ủ trong tủ ấm 35-37°C, điều kiện khí trường phù hợp cho từng loại bệnh phẩm, từng loài vi khuẩn.
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ, nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hoá học đơn giản.
- Định danh bằng phương pháp khối phổ/hoặc phương pháp sinh vật hóa học trên hệ thống tự động theo hướng dẫn của nhà sản xuất hệ thống định danh sử dụng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không có vi khuẩn mọc hoặc không phân lập được vi khuẩn gây bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lấy thiếu hoặc thừa thể tích máu/dịch vô trùng vào chai cấy máu có thể gây âm tính giả hoặc dương tính giả.
- Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.
- Nếu có yêu cầu tìm căn nguyên vi khuẩn hiếm gặp, phải ghi yêu cầu cụ thể.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

35. Vi nấm nuôi cấy, định danh hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nuôi cấy, phân lập và định danh vi nấm gây bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Chai cấy máu/dịch vô trùng được theo dõi hàng ngày trong hệ thống máy cấy máu tự động. Máy cấy máu tự động ủ và lắc liên tục. Đèn huỳnh quang trong máy quét 10 phút/lần vào lớp màng ở đáy chai để phát hiện nồng độ CO₂. Nếu có sự phát triển của vi nấm, CO₂ sẽ được giải phóng ra môi trường, hệ thống máy cấy máu sẽ phát hiện và báo kết quả dương tính.

Các bệnh phẩm khác được nuôi cấy thông thường nhưng khi mẫu cấy dương tính và chai cấy máu báo dương sẽ được định danh bằng hệ thống tự động dựa trên tính chất sinh vật hóa học của vi nấm hoặc bằng phương pháp khối phổ dựa trên tính chất của protein vi nấm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Chai cấy máu
- Môi trường nuôi cấy
- Lactophenol Coton Blue
- Nước muối sinh lý
- KOH 20 %
- Mực tàu
- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Dầu soi kính
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm

- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đầu tip loại 1000 μ l
- Đầu tip loại 200 μ l
- Lam kính
- Vật tư cần thiết định danh theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Que cấy nhựa
- Tăm tre
- Tube Eppendorf
- Ống tube định danh 5ml
- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Chủng chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH

- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống máy cấy mẫu tự động
- Hệ thống định danh tự động
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu, dịch vô trùng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 168-240 giờ (7 – 10 ngày) có thể lâu hơn cho các loài vi nấm mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Cấy máu

- Đưa chai cấy máu vào máy cấy máu tự động.
- Lấy chai cấy máu ra ngoài
- Nếu máy báo chai cấy máu dương tính:
 - + Nhuộm soi đánh giá kết quả sơ bộ.
 - + Cấy chuyển bệnh phẩm ra môi trường đĩa.
 - + Ủ trong tủ ấm 30°C khí trường thường.

- + Bất khuẩn lạc nghi ngờ, nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hoá học đơn giản.
- + Định danh bằng phương pháp khối phổ/hoặc phương pháp sinh vật hóa học trên hệ thống tự động theo hướng dẫn của nhà sản xuất hệ thống định danh sử dụng.

4.1.2. Các bệnh phẩm khác: Nuôi cấy nấm trên môi trường Sabouraud, ủ ấm ở nhiệt độ 30°C và/hoặc 37°C, khí trường thường.

- Bệnh phẩm là da, tóc, móng: Cắt nhỏ bệnh phẩm cấy 6 - 8 điểm trên đĩa Sabouraud.
- Bệnh phẩm là các chất dịch: Hút 3- 5 giọt dịch cấy dàn trên đĩa Sabouraud.
- Bệnh phẩm là nước tiểu: Sử dụng kỹ thuật cấy định lượng.
- Bất khuẩn lạc nghi ngờ, quan sát đặc điểm khuẩn lạc, bào tử (nếu có), nhuộm soi khuẩn lạc hoặc nhuộm soi bào tử (nếu có).
- Định danh bằng phương pháp khối phổ/hoặc phương pháp sinh vật hóa học trên hệ thống tự động theo hướng dẫn của nhà sản xuất hệ thống định danh sử dụng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi nấm gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không có vi nấm mọc hoặc không phân lập được vi nấm gây bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lấy máu/dịch vô trùng không đúng thể tích quá nhiều hoặc quá ít.
- Chủng nấm không thuần thì kết quả định danh cho nhiều đáp án, khi đó ta phải ria lại riêng rẽ để được chủng nấm thuần.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

36. Vi khuẩn kháng thuốc định tính

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây bệnh bằng phương pháp kháng sinh khuếch tán trong thạch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn thử nghiệm được đánh giá bằng phương pháp kháng sinh khuếch tán trong thạch. Sự phát triển của vi khuẩn sẽ bị ức chế khi kháng sinh đạt đến một nồng độ nhất định. Đường kính vùng ức chế tỷ lệ thuận với mức độ nhạy cảm được phiên giải ra các phân loại **S** (sensitive – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng) theo hướng dẫn CSLI và/hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

Định nghĩa:

- + **S (Susceptibility) - Nhạy cảm:** Một vi khuẩn được coi là nhạy cảm với một kháng sinh nào đó có nghĩa là khi nhiễm trùng do vi khuẩn này gây ra sẽ đáp ứng với phác đồ điều trị bằng kháng sinh thử nghiệm với liều lượng được khuyến cáo.
- + **I (Intermediate) - Trung gian:**
 - Khi áp dụng cho một chủng vi khuẩn coi là đề kháng trung gian với một kháng sinh nào đó có nghĩa là nhiễm trùng do vi khuẩn này có thể đáp ứng với phác đồ điều trị kháng sinh nhưng với liều lượng cao hơn liều khuyến cáo để kháng sinh có thể tập trung nhiều hơn đến ổ nhiễm trùng.
 - Khi áp dụng cho một chủng vi khuẩn coi là đề kháng trung gian với một kháng sinh nào đó có nghĩa là nhiễm trùng do vi khuẩn này có thể đáp ứng với phác đồ điều trị kháng sinh với liều lượng khuyến cáo nhưng với điều kiện kháng sinh có đặc tính tập trung nhiều hơn ở ổ nhiễm trùng.
- + **R (Resistant) - Đề kháng:** Một vi khuẩn được coi là đề kháng với một kháng sinh nào đó có nghĩa là khi nhiễm trùng do vi khuẩn này gây ra sẽ không đáp ứng với phác đồ điều trị bằng kháng sinh thử nghiệm với liều lượng được khuyến cáo.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.3. Thiết bị y tế

- Thạch Muller Hinton hoặc các môi trường làm kháng sinh đồ thích hợp
- Thạch máu
- Khoanh giấy kháng sinh

- Nước muối sinh lý
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*
- Que gỗ
- Que tăm bông
- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Đèn cồn
- Chủng chuẩn
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex

- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chúng vi khuẩn được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần và mới.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm: sau khi có kết quả định danh vi khuẩn 24 - 48 giờ (1 – 2 ngày) có thể kéo dài hơn với các vi khuẩn mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Chúng vi khuẩn cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 16-24 giờ).

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Pha huyền dịch vi khuẩn: Pha huyền dịch vi khuẩn: Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ 3-5 khuẩn lạc có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống nước muối sinh lý 5 ml, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất có độ đục tương ứng với độ đục của ống McFarland 0,5.
- Dàn đều canh khuẩn lên mặt đĩa thạch: Dùng tăm bông vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn tăm bông trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt phần huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông. Sau đó, ria đều que tăm bông trên toàn bộ mặt đĩa thạch Mueller-Hinton sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt đĩa thạch.
- Đặt các khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch: Các khoanh giấy sau khi đặt cần được ấn xuống vừa phải để đảm bảo chúng được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Trong

vòng 15 phút sau khi pha huyền dịch vi khuẩn, các đĩa thạch phải được lật úp để trong tủ ẩm 35°C.

- Một lượng nhỏ huyền dịch được ria lên đĩa cấy thuần.
- Ủ đĩa thạch trong tủ ẩm 16 - 24 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC, đĩa thuần đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Đo đường kính vùng ức chế (bao gồm cả đường kính của khoanh giấy kháng sinh) tính theo mm.
- Phiên giải đường kính vùng ức chế ra kết quả S, I, R theo hướng dẫn của CLSI cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do khoanh giấy kháng sinh và môi trường thực hiện không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.

Sai sót có thể gặp khi:

- Lẫn hai hay nhiều chủng vi khuẩn
- Vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.

Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

37. *Neisseria gonorrhoeae* kháng thuốc định tính

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae* bằng phương pháp khoan giấy kháng sinh khuếch tán.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý:

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *N. gonorrhoeae* được đánh giá bằng phương pháp kháng sinh khuếch tán trong thạch. Sự phát triển của vi khuẩn sẽ bị ức chế khi kháng sinh đạt đến một nồng độ nhất định. Đường kính vùng ức chế tỷ lệ thuận với mức độ nhạy cảm được phiên giải ra các phân loại S (sensitive – nhạy cảm), I (intermediate – trung gian), hoặc R (resistant – đề kháng) khi so sánh với bảng chuẩn Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) cập nhật hàng năm.

Định nghĩa:

- Kháng sinh: là những chất có hoạt tính kháng khuẩn mà ngay ở nồng độ thấp đã có tác dụng ức chế hoặc tiêu diệt vi khuẩn một cách đặc hiệu
- Kháng sinh đồ: là kỹ thuật được thực hiện trong phòng xét nghiệm nhằm xác định độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Khoanh giấy kháng sinh
- Môi trường nuôi cấy phân lập cho vi khuẩn *N.gonorrhoeae*
- Môi trường làm kháng sinh đồ cho vi khuẩn *N.gonorrhoeae*
- Môi trường lưu giữ chủng
- Môi trường cấy chuyển chủng
- Độ đục chuẩn McFarland 0,5
- Nước muối sinh lý
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh

- Que cấy
- Tăm bông vô trùng
- Ống thủy tinh vô trùng
- Giấy lau bề mặt
- Pipet pasteur
- Giá đựng ống nghiệm
- Kẹp để phân phối khoanh giấy kháng sinh
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Bật lửa
- Chủng chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Tủ ấm 35°C-37°C, 5% CO₂
- Máy đo độ đục
- Máy Vortex
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Chứng *Neisseria gonorrhoeae* phân lập từ mẫu bệnh nhân được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc
- Yêu cầu:
 - + Các khuẩn lạc *Neisseria gonorrhoeae* phải thuần nhất và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (sau 20-24 giờ nuôi cấy trong điều kiện tối ưu).
 - + Chứng *Neisseria gonorrhoeae* lưu trữ từ ống giữ chủng cần được cấy chuyển trên môi trường phù hợp ít nhất hai lần.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 1.440 phút (24 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

a. Chuẩn bị môi trường, khoanh giấy kháng sinh

- Để đĩa môi trường làm KSD, khoanh giấy kháng sinh về nhiệt độ phòng
- Lựa chọn các khoanh giấy kháng sinh theo khuyến cáo của CLSI cập nhật hàng năm.

b. Pha huyền dịch vi khuẩn

- Dùng que cấy lấy 3-5 khuẩn lạc vi khuẩn có hình thái giống nhau từ đĩa thạch nuôi cấy thuần và nghiền đều vào ống nước muối sinh lý, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất. Đo độ đục của huyền dịch vi khuẩn để đạt $0,5 \pm 0,05$ McFarland. Có thể điều chỉnh thêm vi khuẩn hoặc thêm nước muối vào ống canh khuẩn sao cho ống canh khuẩn đạt được độ đục theo yêu cầu trên. Huyền dịch vi khuẩn sau khi pha, phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút.

c. Trãi huyền dịch vi khuẩn trên mặt thạch

- Dùng que tăm bông vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn que tăm bông trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông. Sau đó ria đều que tăm bông trên toàn bộ mặt đĩa thạch theo góc 60° rồi ria đều que tăm bông. Cứ tiếp tục xoay đĩa một

góc 60° và rìa que tắm bông để sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt thạch. Cuối cùng, rìa tắm bông (que gòn) vòng quanh bờ mép của mặt thạch.

- Đóng nắp đĩa thạch và để đĩa thạch sau rìa cây vài phút ở nhiệt độ phòng cho mặt thạch se lại hoàn toàn trước khi đặt khoanh giấy kháng sinh.

d. Đặt khoanh giấy kháng sinh

- Có thể dùng panh kẹp hoặc đầu kim vô trùng để đặt các khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch. Các khoanh giấy sau khi đặt cần được ấn xuống vừa phải để đảm bảo chúng được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Tối đa chỉ nên đặt 4 khoanh giấy trên đĩa thạch đường kính 9-10 cm, 9 khoanh cho đĩa đường kính 15 cm.
- Trong vòng 15 phút sau khi đã đặt khoanh giấy kháng sinh, cho các đĩa thạch vào trong tủ ẩm 35-37 °C, 5% CO₂. Ủ đĩa thạch trong 20-24 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả nội kiểm
- Chỉ đọc kết quả kháng sinh đồ chủng người bệnh khi kết quả QC đạt.
- Đọc kết quả. không đọc kết quả khi đĩa thạch mọc lẫn hai hay nhiều loại vi khuẩn, khi vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.
- Đo đường kính vùng ức chế (bao gồm cả đường kính của khoanh giấy kháng sinh) tính theo mm.
- Phiên giải kết quả. phiên giải đường kính vùng ức chế ra kết quả S, I, R theo hướng dẫn của CLSI cập nhật hàng năm.

4.4. Trả kết quả và lưu hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Chủng vi khuẩn không thuần nhất hoặc chủng quá già hay quá non đều ảnh hưởng đến đường kính vùng ức chế. Cần rìa lại chủng cho thuần nhất và ủ ở điều kiện tối ưu trong thời gian 20-24 giờ.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Đĩa kháng sinh đồ mọc hai hay nhiều loại vi khuẩn: kiểm tra lại độ thuần nhất của chủng, đĩa môi trường làm kháng sinh đồ, nước muối sinh lý, các vật tư vô trùng

trong quá trình thực hiện kỹ thuật có đảm bảo vô trùng không. Thực hiện lại thử nghiệm, chú ý tuân thủ thao tác vô trùng.

- Vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá mỏng: thực hiện lại thử nghiệm, chú ý đo đúng độ đục huyền dịch, đảm bảo chủng được nuôi cấy đủ thời gian và trong điều kiện tối ưu, lấy đủ lượng huyền dịch trải đều lên mặt thạch.
- Khoanh giấy kháng sinh bị rơi ra khỏi bề mặt thạch: do bề mặt thạch quá ướt nên khoanh kháng sinh bị trôi hoặc khi đặt không ấn khoanh kháng sinh xuống mặt thạch. Thực hiện lại xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

38. *Neisseria meningitidis* kháng thuốc

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* bằng phương pháp khoan giấy kháng sinh khuếch tán.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *N. meningitidis* được đánh giá bằng phương pháp kháng sinh khuếch tán trong thạch. Sự phát triển của vi khuẩn sẽ bị ức chế khi kháng sinh đạt đến một nồng độ nhất định. Đường kính vùng ức chế tỷ lệ thuận với mức độ nhạy cảm được phiên giải ra các phân loại **S** (sensitive – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng) khi so sánh với bảng chuẩn Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) cập nhật hàng năm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Thanh kháng sinh (Etest)
- Khoan giấy kháng sinh
- Môi trường phân lập vi khuẩn cho *N. Meningitidis*
- Môi trường làm kháng sinh đồ cho *N. Meningitidis*
- Môi trường lưu giữ chủng
- Môi trường cấy chuyển chủng
- Độ đục chuẩn McFarland 0,5
- Nước muối sinh lý
- Cồn 70%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Que cấy
- Tăm bông vô trùng
- Ống thủy tinh vô trùng
- Giấy lau bề mặt

- Pipet Pasteur
- Giá đựng ống nghiệm
- Kẹp để phân phối khoanh giấy kháng sinh
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Bật lửa
- Chũm chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Tủ ấm 35°C - 37°C, 5% CO₂
- Máy đo độ đục
- Máy Vortex
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Chủng *Neisseria meningitidis* phân lập từ mẫu bệnh nhân được nuôi cấy trên môi trường Thạch máu hoặc Thạch Chocolate
- Yêu cầu:
 - + Các khuẩn lạc *Neisseria meningitidis* phải thuần nhất và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (sau 20-24 giờ nuôi cấy trong điều kiện tối ưu).

+ Chủng *Neisseria meningitidis* lưu trữ từ ống giữ chủng cần được cấy chuyển trên môi trường phù hợp ít nhất hai lần.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: Khoảng 24 giờ.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

a. Chuẩn bị môi trường, khoanh giấy kháng sinh

- Để đĩa môi trường làm KSD, khoanh giấy kháng sinh, thanh kháng sinh về nhiệt độ phòng
- Lựa chọn các khoanh giấy kháng sinh, thanh kháng sinh Etest theo khuyến cáo của CLSI cập nhật hàng năm.

b. Pha huyền dịch vi khuẩn

- Dùng que cấy lấy 3-5 khuẩn lạc vi khuẩn có hình thái giống nhau từ đĩa thạch nuôi cấy thuần và nghiền đều vào ống nước muối sinh lý 5 mL, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất. Đo độ đục của huyền dịch vi khuẩn để đạt $0,5 \pm 0,05$ McFarland. Có thể điều chỉnh thêm vi khuẩn hoặc thêm nước muối vào ống canh khuẩn sao cho ống canh khuẩn đạt được độ đục theo yêu cầu trên. Huyền dịch vi khuẩn sau khi pha, phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút.

c. Trải huyền dịch vi khuẩn trên mặt thạch

- Dùng que tăm bông vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn que tăm bông trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông. Sau đó ria đều que tăm bông trên toàn bộ mặt đĩa thạch theo góc 60° rồi ria đều que tăm bông. Cứ tiếp tục xoay đĩa một góc 60° và ria que tăm bông để sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt thạch. Cuối cùng, ria tăm bông (que gòn) vòng quanh bờ mép của mặt thạch.

- Đóng nắp đĩa thạch và để đĩa thạch sau rìa cây vài phút ở nhiệt độ phòng cho mặt thạch se lại hoàn toàn trước khi đặt kháng sinh.

d. Đặt khoanh giấy kháng sinh, Etest

- Có thể dùng panh kẹp hoặc đầu kim vô trùng để đặt các khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch. Các khoanh giấy sau khi đặt cần được ấn xuống vừa phải để đảm bảo chúng được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Tối đa chỉ nên đặt 2 khoanh giấy trên đĩa thạch đường kính 9-10 cm, 5 khoanh cho đĩa đường kính 15 cm.
- Dùng kẹp lấy thanh E-test đặt lên trên mặt thạch đã rìa vi khuẩn sao cho mặt có ghi tên kháng sinh và nồng độ kháng sinh phải hướng lên trên
- Đảm bảo toàn bộ bề mặt thanh E-test tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch và không di chuyển vị trí thanh E-test sau khi đã đặt xong.
- Đặt tối đa 6 thanh E-test đối với đĩa thạch đường kính 150 mm và 2 thanh E-test đối với đường kính 90mm.
- Trong vòng 15 phút sau khi đã đặt thanh E-test, khoanh giấy kháng sinh cho các đĩa thạch vào trong tủ ẩm 35°C - 37°C, 5% CO₂. Ủ đĩa thạch trong 20-24 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả kháng sinh đồ chủng người bệnh khi kết quả QC đạt.

4.2.2. Đọc kết quả

- Không đọc kết quả khi đĩa thạch mọc lẫn hai hay nhiều loại vi khuẩn, khi vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.
- Dùng thước kẻ có chia vạch đến mm hoặc thước kẹp, mở nắp đĩa thạch, đo đường kính vùng ức chế hoàn toàn (bao gồm cả đường kính của khoanh giấy kháng sinh) tính theo mm
- Đọc giá trị MIC ở điểm cắt của hình Elip với thanh E-test.
- Làm tròn giá trị MIC ở điểm giữa hai bậc pha loãng lên giá trị cao hơn trước khi làm phiên giải kết quả.

4.2.3 Phiên giải kết quả

- Phiên giải kết quả ra S, I, R theo hướng dẫn của CLSI cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Chủng vi khuẩn không thuần nhất hoặc chủng quá già hay quá non đều ảnh hưởng đến đường kính vùng ức chế. Cần rĩa lại chủng cho thuần nhất và ủ ở điều kiện tối ưu trong thời gian 20-24 giờ.
- Bảo quản khoanh giấy kháng sinh đúng theo quy định của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Đĩa kháng sinh đồ mọc hai hay nhiều loại vi khuẩn: kiểm tra lại độ thuần nhất của chủng, đĩa môi trường làm kháng sinh đồ, nước muối sinh lý, các vật tư vô trùng trong quá trình thực hiện kỹ thuật có đảm bảo vô trùng không. Thực hiện lại thử nghiệm, chú ý tuân thủ thao tác vô trùng.
- Vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá mỏng: thực hiện lại thử nghiệm, chú ý đo đúng độ đục huyền dịch, đảm bảo chủng được nuôi cấy đủ thời gian và trong điều kiện tối ưu, lấy đủ lượng huyền dịch trải đều lên mặt thạch.
- Khoanh giấy kháng sinh bị rơi ra khỏi bề mặt thạch: do bề mặt thạch quá ướt nên khoanh kháng sinh bị trôi hoặc khi đặt không ấn khoanh kháng sinh xuống mặt thạch. Thực hiện lại thử nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.

4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

ngoctlv.kcb - Truong Le Van Ngoc - 04/09/2023 - 16:23:00

39. Vi nấm kháng thuốc định tính

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm với thuốc kháng nấm của vi nấm bằng phương pháp khoan giấy khuếch tán.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Mức độ nhạy cảm với các tác nhân kháng nấm của vi nấm được đánh giá bằng phương pháp khoan giấy khuếch tán và được phiên giải ra phân loại S, I, R dựa trên tài liệu hướng dẫn của Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) được cập nhật hàng năm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Khoanh kháng nấm
- Môi trường nuôi cấy phân lập cho vi nấm
- Môi trường làm kháng nấm đồ
- Môi trường lưu giữ chủng
- Môi trường cấy chuyển chủng
- Độ đục chuẩn McFarland 0,5 và 1
- Nước muối sinh lý
- Cồn 70%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Que cấy
- Tăm bông vô trùng
- Ống thủy tinh vô trùng
- Giấy lau bề mặt
- Pipet Pasteur
- Giá đựng ống nghiệm
- Kẹp để phân phối khoan giấy kháng sinh

- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Bật lửa
- Chủng chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Tủ ấm 35°C - 37°C, 5% CO₂
- Máy đo độ đục
- Máy Vortex
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi nấm phân lập được từ mẫu bệnh nhân được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc.
- Yêu cầu: Chủng thuần, được nuôi cấy qua đêm Candida 24 giờ - 48 giờ, C. neoformans 48 giờ - 72 giờ ở 35°C ± 2°C.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 24 giờ.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

a. Chuẩn bị môi trường, khoanh kháng nấm

- Để đĩa môi trường làm KSD, khoanh giấy kháng nấm về nhiệt độ phòng
- Lựa chọn các khoanh giấy kháng nấm theo khuyến cáo của CLSI cập nhật hàng năm.

b. Pha huyền dịch vi nấm

- Dùng que cấy lấy 3-5 khuẩn lạc vi nấm có hình thái giống nhau từ đĩa thạch nuôi cấy thuần và nghiền đều vào ống nước muối sinh lý, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất. Đo độ đục của huyền dịch vi khuẩn để đạt 0,5 McFarland đối với *Candida* spp. và 1.0 McFarland với *C. neoformans*. Có thể điều chỉnh thêm khuẩn lạc hoặc thêm nước muối vào ống canh khuẩn sao cho ống canh khuẩn đạt được độ đục theo yêu cầu trên. Huyền dịch vi nấm sau khi pha phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút.

c. Trãi huyền dịch nấm trên mặt thạch

- Dùng que tăm bông vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi nấm đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn que tăm bông trên thành bên của ống huyền dịch vi nấm để loại bớt huyền dịch vi nấm đã thấm vào đầu tăm bông. Sau đó rìa đều que tăm bông trên toàn bộ mặt đĩa thạch theo góc 60° rồi rìa đều que tăm bông. Cứ tiếp tục xoay đĩa một góc 60° và rìa que tăm bông để sao cho vi nấm được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt thạch. Cuối cùng, rìa tăm bông (que gòn) vòng quanh bờ mép của mặt thạch.
- Đóng nắp đĩa thạch và để đĩa thạch sau rìa cấy vài phút ở nhiệt độ phòng cho mặt thạch se lại hoàn toàn trước khi đặt khoanh giấy kháng nấm.

d. Đặt khoanh giấy kháng nấm

- Có thể dùng panh kẹp hoặc đầu kim vô trùng để đặt các khoanh giấy kháng nấm lên mặt thạch. Các khoanh giấy sau khi đặt cần được ấn xuống vừa phải để đảm bảo chúng được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Tối đa chỉ nên đặt 05 khoanh giấy trên đĩa thạch đường kính 9-10 cm, 12 khoanh cho đĩa đường kính 15 cm.

- Trong vòng 15 phút sau khi đã đặt khoanh giấy kháng nấm, cho các đĩa thạch vào trong tủ ẩm $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Ủ đĩa thạch trong 20-24 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả kháng nấm đồ chủng người bệnh khi kết quả QC đạt.

4.2.2. Đọc kết quả

- Không đọc kết quả khi đĩa thạch mọc lẫn hai hay nhiều loại vi khuẩn, vi nấm, khi vi nấm mọc quá dày hoặc quá thưa.
- Đọc kết quả ở 48 giờ khi quan sát thấy vi nấm không mọc sau 24 giờ ủ.
- Đo đường kính vùng ức chế (bao gồm cả đường kính của khoanh giấy kháng nấm) tính theo mm.

4.2.3. Phiên giải kết quả

- Phiên giải đường kính vùng ức chế ra kết quả S, I, R theo hướng dẫn của CLSI cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Chủng vi nấm không thuần nhất hoặc chủng quá già hay quá non đều ảnh hưởng đến đường kính vùng ức chế. Cần rĩa lại chủng cho thuần nhất và ủ ở điều kiện tối ưu.
- Bảo quản khoanh giấy kháng nấm đúng theo quy định của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Đĩa kháng nấm đồ bị nhiễm: kiểm tra lại độ thuần nhất của chủng, đĩa môi trường làm kháng nấm đồ, nước muối sinh lý, các vật tư vô trùng trong quá trình thực hiện kỹ thuật có đảm bảo vô trùng không. Thực hiện lại thử nghiệm, chú ý tuân thủ thao tác vô trùng.
- Vi nấm mọc quá dày hoặc quá mỏng: thực hiện lại thử nghiệm, chú ý đo đúng độ đục huyền dịch, đảm bảo chủng được nuôi cấy đủ thời gian và trong điều kiện tối ưu, lấy đủ lượng huyền dịch trải đều lên mặt thạch.
- Khoanh giấy kháng nấm bị rơi ra khỏi bề mặt thạch: do bề mặt thạch quá ướt nên khoanh kháng nấm bị trôi hoặc khi đặt không ấn khoanh kháng nấm xuống mặt thạch. Thực hiện lại thử nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

40. Vi khuẩn kháng thuốc hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các vi khuẩn bằng hệ thống tự động dựa trên nguyên lý kháng sinh đồ pha loãng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Ngay sau khi huyền dịch vi khuẩn được đổ vào panel, panel được đưa vào máy và tiếp tục ủ ở 35°C. Máy sẽ đọc sau mỗi 20 phút, thời gian tối đa cho kết quả kháng sinh đồ là 16 giờ. Hệ thống sử dụng chỉ thị oxy hóa kết hợp phương pháp đo độ đục để phát hiện nhanh nồng độ ức chế tối thiểu MIC của mỗi vi sinh vật đối với mỗi kháng sinh. Mỗi panel kháng sinh có chứa nhiều loại kháng sinh với nồng độ pha loãng bậc hai. Kết quả giá trị MIC được phiên giải ra các phân loại **S** (sensitive – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng) theo hướng dẫn CSLI và/hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Thạch máu
- Dung dịch pha huyền dịch
- Canh thang kháng sinh đồ
- Chất chỉ thị màu
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*
- Que gỗ vô trùng
- Que tăm bông vô trùng
- Panel kháng sinh
- Nắp đậy Panel
- Đầu tip

- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Đèn cồn
- Chủng chuẩn
- Giá đặt Panel
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục BD BBL CrystalSpec Nephelometer
- Máy vortex
- Hệ thống máy Phoenix M50
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Pipette 25 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chủng vi khuẩn được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần và mới.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm: sau khi có kết quả định danh vi khuẩn 24-48 giờ (1- 2 ngày) có thể kéo dài hơn với các vi khuẩn mọc chậm, không mọc được trong các panel kháng sinh.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 16-24 giờ).

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Chọn panel kháng sinh phù hợp
- Mở bao, lấy panel đã chọn, đặt lên khay, ghi mã bệnh phẩm cho từng mẫu.
- Chuẩn bị huyền dịch từ khuẩn lạc thuần đã được nuôi cấy thuần và mới có độ đục theo hướng dẫn của nhà sản xuất cho từng loài vi khuẩn.
- Chuyển 1 thể tích huyền dịch vi khuẩn đã pha sang ống chứa canh thang kháng sinh đồ đã bổ sung chất chỉ thị theo hướng dẫn của nhà sản xuất và chuyển 1 lượng huyền dịch nhỏ sang đĩa thạch cấy thuần.
- Chuyển huyền dịch trong ống canh thang kháng sinh đồ sau khi lắc đều vào panel kháng sinh, đóng nắp panel.
- Đưa panel kháng sinh vào hệ thống máy tự động theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Ủ đĩa thạch cấy thuần trong tủ ấm 16 - 24 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC, đĩa thuần đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả: Kết quả là các giá trị MIC của mỗi kháng sinh sẽ được máy ghi nhận và phiên giải ra phân loại S, I, R. Lựa chọn trả các kết quả kháng sinh phù hợp với từng loài vi khuẩn và từng ổ nhiễm trùng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do kháng sinh trong panel không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Huyền dịch vi khuẩn pha không đảm bảo đúng tiêu chuẩn (quá loãng hoặc quá đặc) hoặc để quá lâu mới làm các bước tiếp theo.
- Lẫn hai hay nhiều chủng vi khuẩn
- Lượng chỉ thị không chuẩn.
- Chủng vi khuẩn quá nhày, mọc chậm có thể không thực hiện được.
- Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.

41. Vi khuẩn kháng thuốc nhóm Carbapenemase trên máy tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện vi khuẩn kháng thuốc nhóm Carbapenemase bằng hệ thống máy tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm dựa trên sự tăng trưởng hay không tăng trưởng của một số vi khuẩn trong hệ thống máy tự động để phát hiện kiểu hình sinh Carbapenemase và phân loại các vi khuẩn kháng thuốc nhóm Carbapenem.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất, vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Môi trường lưu giữ chủng
- Môi trường cấy chuyên chủng
- Độ đục chuẩn McFarland 0,5
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Que cấy
- Đầu côn (típ) có lọc, tiệt trùng
- Giấy lau bề mặt
- Pipet Pasteur
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn

- Bật lửa
- Chủng chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Hệ thống máy tự động
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Tủ ẩm 35°C - 37°C, 5% CO₂
- Máy đo độ đục
- Máy Vortex
- Pipette các loại
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu bệnh nhân được nuôi cấy trên môi trường thích hợp.
- Yêu cầu:
 - + Khuẩn lạc vi khuẩn Gram âm thuần được nuôi cấy trên môi trường thường 18-24 giờ ở điều kiện thích hợp.
 - + Đối với chủng vi khuẩn lưu trữ từ ống giữ chủng cần được cấy chuyển trên môi trường phù hợp ít nhất 2 lần.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 24 giờ.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Các thiết bị phòng xét nghiệm được hiệu chuẩn định kỳ theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Để các hóa chất sinh phẩm được bảo quản trong tủ lạnh về nhiệt độ phòng
- Pha huyền dịch vi khuẩn
- Tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất hệ thống máy tự động mà phòng xét nghiệm sử dụng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Kết quả trên hệ thống được kết nối với máy tính đi kèm
- Kết quả test carbapenemase dương tính: vi khuẩn sinh carbapenemase
- Kết quả test carbapenemase âm tính: vi khuẩn không sinh carbapenemase

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Chứng vi khuẩn không thuần nhất hoặc chủng quá già hay quá non đều ảnh hưởng đến kết quả. Cần ria lại chủng cho thuần nhất và ủ ở điều kiện thích hợp từ 18-24 giờ.
- Bảo quản hóa chất sinh phẩm theo đúng quy định của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kết quả trên hệ thống máy tự động cảnh báo hoặc không phù hợp: cần xem xét lại tùy theo loại cảnh báo và nguyên nhân theo hướng dẫn của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

42. Vi nấm kháng thuốc hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm với thuốc kháng nấm của vi nấm bằng hệ thống tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Mức độ nhạy cảm với các tác nhân kháng nấm của vi nấm được đánh giá bằng hệ thống tự động và được phiên giải ra phân loại S, I, R dựa trên tài liệu hướng dẫn của Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) được cập nhật hàng năm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ Vi sinh hoặc Bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ kháng nấm đồ tự động
- Môi trường nuôi cấy phân lập cho vi nấm
- Môi trường làm kháng nấm đồ
- Môi trường lưu giữ chủng
- Môi trường cấy chuyển chủng
- Độ đục chuẩn McFarland 0,5 và 1
- Nước muối sinh lý
- Cồn 70%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Que cấy
- Tăm bông vô trùng
- Ống thủy tinh vô trùng
- Giấy lau bề mặt
- Pipet Pasteur
- Giá đựng ống nghiệm
- Kẹp để phân phối khoanh giấy kháng sinh
- Hộp lưu chủng

- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Bật lửa
- Chủng chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Tủ ẩm 35°C - 37°C, 5% CO₂
- Máy định danh và kháng sinh đồ
- Máy đo độ đục
- Máy Vortex
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi nấm phân lập được từ mẫu bệnh nhân được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc.
- Yêu cầu: Chủng thuần, được nuôi cấy qua đêm *Candida* 24 giờ - 48 giờ, *C. neoformans* 48 giờ - 72 giờ ở 35°C ± 2°C.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 24 giờ.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Dùng que cấy lấy 3-5 khuẩn lạc vi nấm có hình thái giống nhau từ đĩa thạch nuôi cấy thuần và nghiền đều vào ống nước muối sinh lý, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất. Đo độ đục của huyền dịch vi khuẩn để đạt 0,5 McFarland đối với *Candida* spp. và 1.0 McFarland với *C. neoformans*. Có thể điều chỉnh thêm khuẩn lạc hoặc thêm nước muối vào ống canh khuẩn sao cho ống canh khuẩn đạt được độ đục theo yêu cầu trên. Huyền dịch vi nấm sau khi pha phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút.
- Chuyển thể tích huyền dịch theo yêu cầu sang thẻ kháng nấm đồ.
- Nhập máy và đưa thẻ kháng nấm đồ vào máy tự động.
- Cấy chuyển 10 μ L huyền dịch đã pha vào ¼ đĩa UTI để kiểm tra độ thuần.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Thực hiện QC theo quy định: hàng tuần và mỗi khi dùng lô mới
- Chỉ đọc kết quả kháng nấm đồ chủng người bệnh khi kết quả QC đạt.

4.2.2. Đọc kết quả

- Không đọc kết quả khi đĩa thạch mọc lẫn hai hay nhiều loại vi khuẩn, vi nấm, khi vi nấm mọc quá dày hoặc quá thưa.
- Đọc kết quả ở 48 giờ khi quan sát thấy vi nấm không mọc sau 24 giờ ủ.

4.2.3. Phiên giải kết quả

- Phiên giải kết quả kháng nấm đồ theo hướng dẫn của CLSI cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Chủng vi nấm không thuần nhất hoặc chủng quá già hay quá non đều ảnh hưởng đến kết quả. Cần rĩa lại chủng cho thuần nhất và ủ ở điều kiện tối ưu.
- Bảo quản thể kháng nấm đúng theo quy định của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Đĩa kháng nấm đồ bị nhiễm: kiểm tra lại độ thuần nhất của chủng, dung dịch pha huyền dịch vi nấm, các vật tư vô trùng trong quá trình thực hiện kỹ thuật có đảm bảo vô trùng không. Thực hiện lại thử nghiệm, chú ý tuân thủ thao tác vô trùng.
- Đo đúng độ đục huyền dịch theo hướng dẫn của nhà sản xuất, nồng độ cao hay thấp so với quy định sẽ ảnh hưởng đến kết.
- Thẻ kháng sinh đồ nấm hết hạn: Kiểm tra hạn sử dụng của thẻ kháng nấm đồ trước khi tiến hành xét nghiệm, không sử dụng thẻ đã quá hạn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
2. Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
3. Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

43. Virus Ag miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng nguyên (Ag) của virus trong các mẫu bệnh phẩm huyết thanh hoặc huyết tương của người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.3. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiết trùng
- Ống Falcol 5-15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml, 1000 ml
- Bàn xét nghiệm.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Xét nghiệm định tính
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
5	Nhỏ dung dịch pha loãng, mẫu, chứng vào giếng.
6	Trộn đều hoặc lắc phiến vi lượng sau khi thực hiện bước hút nhỏ
7	Đậy tấm và ủ.
8	Rửa phiến nhựa.
9	Chuẩn bị chất cộng hợp
10	Nhỏ dung dịch chất cộng hợp vào tất cả các giếng
11	Đậy tấm và ủ.
12	Rửa phiến nhựa
13	Chuẩn bị dung dịch hiện màu
14	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
15	Ủ phiến nhựa. Không đậy tấm và tránh ánh sáng
16	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
17	Đọc độ hấp thụ sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

- Dương tính
- Âm tính
- Nghi ngờ

Nếu kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

44. Virus Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên (Ag) kháng virus.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Bằng kỹ thuật CMIA gián tiếp (VD hoặc nguyên lý tương đương).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm, hóa chất
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút (1 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất, sinh phẩm xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Vào Reagent để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn: + Nếu tại vị trí có ô xét nghiệm cần thực hiện hiển thị dòng chữ no cal có nghĩa đó là lô thuốc thử mới cần phải hiệu chuẩn. + Khi chạy chứng thấy kết quả vượt ra ngoài dải giới hạn cho phép.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên (nếu thấy cần thiết) thì tiến hành chạy chứng
4	Chạy mẫu theo các bước sau:
4.1	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 4.2 – 4.9:	
4.2	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng.
4.3	Vào màn hình Patient Order → Single Patient .
4.4	Nhập - C/P : vị trí mẫu trên khay/ mã khay chứa mẫu - SID : mã số bệnh nhân
4.5	Chọn tên test
4.6	Chọn Sample details để nhập thêm thông tin bệnh nhân (nếu cần)
4.7	Nhấn ADD ORDER (F3) .
4.8	Đưa khay mẫu vào khu nạp giá mẫu ở vị trí chạy mẫu bệnh nhân thường quy.
4.9	Khởi động chạy RUN - Trên màn hình chính, chọn SH & PM - Nhấn RUN (F8)
Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 4.10 – 4.12:	
4.10	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm quản lý thông tin phòng xét nghiệm.
4.11	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
4.12	Nhấn RUN (F8)

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC.

4.2.2. Đọc kết quả:

a. Tính giá trị ngưỡng:

Máy sẽ tự động tính toán kết quả dựa trên tỉ lệ RLU (Relative Light Unit) mẫu với RLU ngưỡng (S/CO) cho mỗi mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng.

b. Diễn giải kết quả

Kết quả được diễn giải như bảng dưới đây:

Kết quả ban đầu (S/CO)	Diễn giải trên thiết bị	Quy trình xét nghiệm lại
< 1,00	KHÔNG PHẢN ỨNG	Không cần thực hiện lại xét nghiệm
$\geq 1,00$	PHẢN ỨNG	Xét nghiệm lại lần 2 (nếu cần)

Tất cả những mẫu bệnh phẩm sau khi kiểm tra lại lần 2:

- + Nếu $S/CO < 1$ thì kết luận âm tính.
- + Nếu $S/CO \geq 1$ giống như lần đầu thì kết luận dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.
- Xử trí:
 - + Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.

- + Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- + Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

45. Dengue virus NS1Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng nguyên NS1 của virus Dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay): Thử nghiệm miễn dịch hấp phụ gắn enzym.
- OD (Optical density): Mật độ quang

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Dengue NS1 Ag (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tuýp đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Ống đong 500 ml, 1000 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất..

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Dengue NS1 Ag ELISA (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: nhập thủ công hoặc nhập bệnh nhân có mã vạch - Thực hiện thao tác nhập xác định bệnh nhân với thử nghiệm Dengue NS1 Ag theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: theo hướng dẫn nhà sản xuất. Ví dụ tương đương

Các bước	Nội dung
	Cho 50 µl dung dịch pha loãng vào các giếng, 50 µl chứng âm vào giếng A1, 50 µl giá trị ngưỡng vào giếng B1 và C1, 50 µl chứng dương vào giếng D1, 50 µl bệnh phẩm vào các giếng còn lại. Cho 100 µl dung dịch cộng hợp đã được pha loãng Rửa 6 lần bằng dung dịch rửa Cho vào mỗi giếng 160 µl TMB Ủ nhiệt độ phòng trong 30 phút Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng Đọc kết quả ở bước sóng 450/620 nm
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ tương đương).

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

Các kết quả xét nghiệm được tính toán bằng phương pháp giá trị ngưỡng được cài đặt trên máy tự động bằng cách:

Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng:

$$\overline{OD\ CO} = (OD\ CO1 + OD\ CO2)/2$$

Tính tỉ số mẫu: Tỉ số mẫu = giá trị OD của mẫu/giá trị ngưỡng

- + Nếu tỉ số $< 0,5$: mẫu thử âm tính, trong huyết thanh không có kháng nguyên NS1.
- + Nếu $0,5 \leq \text{tỉ số} < 1,0$: mẫu thử cần phải xét nghiệm lại. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định
- + Nếu tỉ số $\geq 1,0$: mẫu thử dương tính, trong huyết thanh có kháng nguyên NS1.

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (kiểm tra chất lượng, IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

46. Adenovirus miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể kháng Adenovirus trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể kháng Adenovirus.

Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể kháng Adenovirus sẽ kết hợp với các kháng nguyên Adenovirus được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể kháng Adenovirus bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp
---	---

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

47. Rotavirus Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng nguyên của vi rút Rota trong mẫu bệnh phẩm phân của người bệnh

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng thể để phát hiện kháng nguyên của vi rút Rota
- Ở lần ủ thứ nhất, nếu trong mẫu phân của người bệnh có kháng nguyên Rotavirus sẽ kết hợp với các kháng thể của vi rút Rota được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng thể – kháng nguyên. Ở lần ủ thứ 2, kháng thể kháng của vi rút Rota được thêm vào sẽ kết hợp với phức hợp được tạo ra ở lần ủ thứ nhất. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng thể - kháng nguyên - kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng nguyên đặc hiệu liên kết.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch enzyme phát hiện kháng nguyên Rotavirus trong phân bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu tip hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu tip hút thuốc thử phù hợp với máy
- Đầu côn 1000 µl tiệt trùng (hút dung dịch pha loãng bệnh phẩm)
- Ống eppendoff 1-1,5ml
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng

- Khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA tự động
- Pipette 1000 μ l
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20 °C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu phân của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu phân phải được lấy vào ống nhựa sạch, khô, không lấy lẫn nước tiểu.
 - + Thể tích mẫu phân ít nhất khoảng bằng 1 hạt lạc với phân rắn, và khoảng 2-5ml với phân lỏng.
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Pha loãng mẫu phân, trộn đều và để lắng cặn. Hút dịch nổi cho vào ống eppendoff và đặt vào giá đỡ bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất: - Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã xử lý vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất - Rửa giếng - Nhỏ kháng thể kháng rotavirus vào các giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Nhỏ kháng thể gắn enzym vào các giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ ba - Rửa giếng - Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng - Ủ giếng lần thứ tư (lưu ý tránh ánh sáng) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng
7	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh độ hấp phụ quang đo được của bệnh phẩm với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp
---	---

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

48. Virus Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể (Ab) của virus trong các mẫu bệnh phẩm huyết thanh hoặc huyết tương của người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiệt trùng
- Ống Falcol 5-15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Xét nghiệm định tính
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
5	Nhỏ dung dịch pha loãng, mẫu, chứng vào giếng.
6	Trộn đều hoặc lắc phiến vi lượng sau khi thực hiện bước hút nhỏ
7	Đậy tấm và ủ.
8	Rửa phiến nhựa.
9	Chuẩn bị chất cộng hợp
10	Nhỏ dung dịch chất cộng hợp vào tất cả các giếng
11	Đậy tấm và ủ.
12	Rửa phiến nhựa
13	Chuẩn bị dung dịch hiện màu
14	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
15	Ủ phiến nhựa. Không đậy tấm và tránh ánh sáng
16	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
17	Đọc độ hấp thụ sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

- Dương tính
- Âm tính
- Nghi ngờ

Nếu kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

49. Zika virus IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm này dùng để định tính kháng thể IgM kháng Virus Zika (ZIKV) trong huyết thanh và huyết tương người bằng kỹ thuật miễn dịch gắn enzyme (ELISA).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật miễn dịch gắn enzyme (ELISA). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- ZIKV: Zika Virus
- DILSPE: Dung dịch pha loãng mẫu.
- WASHBUF: Dung dịch rửa
- Conjugate: Chất cộng hợp.
- SUBS TMB: Chất tạo màu.
- H₂SO₄ 0.3M (Axit Sulphuric): Dung dịch dừng phản ứng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm ZIKVIgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 µL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Dàn máy ELISA: máy đọc, máy ủ, máy rửa
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 4°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Đồng hồ bấm giờ 60 phút hoặc cao hơn.
- Máy lắc xoáy hoặc thiết bị trộn tương tự.
- Giấy thấm
- Pipet đơn kênh thể tích từ 10 μ l, 100 μ l và 1000 μ l.
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm ZIKVIgM (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Để bộ sinh phẩm ổn định ở nhiệt độ phòng. Lấy số thanh tương ứng với số mẫu bệnh phẩm, bao gồm cả giếng cho chất hiệu chuẩn, đặt thanh lên giá đỡ nhựa.
2	Pha loãng mẫu 1:101 hút 1 ml dung dịch pha loãng vào các ống dùng một lần và sau đó thêm 10 µl mẫu; trộn trên máy lắc xoáy trước khi dùng. Không pha loãng chất chứng vì có thể dùng ngay. Để trống giếng A1 làm chất trắng
3	Hút 50 µl thuốc thử trung hòa vào các giếng, trừ giếng A1 dùng để làm chất trắng.
4	Trong những vị trí đã định hút 100 µl chất chứng âm lặp lại ba lần, 100 µl chất chứng dương một lần và 100 µl mẫu pha loãng.
5	Ủ khay trong 60 phút ở +37°C.
6	Sau khi ủ lần thứ nhất xong, rửa giếng, thực hiện 4-5 chu kỳ rửa (nhỏ vào + hút ra của 350µl/giếng dung dịch rửa = 1 chu kỳ) là đủ để đảm bảo rằng các xét nghiệm thực hiện như mong đợi. Thời gian ngâm 20-30 giây giữa các chu trình. Thấm khô.
7	Trong các giếng, trừ A1, hút 100 µl chất liên hợp enzyme. Ủ khay trong 60 phút ở +37°C.
8	Sau khi ủ lần thứ hai xong, rửa giếng như bước 6

Các bước	Nội dung
9	Hút 100 µl chất tạo màu/cơ chất vào các giếng, cả giếng A1.
10	Ủ khay tránh sáng ở nhiệt độ phòng (18-24°C) trong 20 phút. Giếng được hút với mẫu dương tính và chất hiệu chuẩn dương đổi màu từ trong sang xanh
11	Hút 100 µl Axit Sulphuric vào tất cả giếng theo như bước 10 để ngăn sự phản ứng enzyme. Thêm dung dịch dừng phản ứng sẽ làm đổi màu chất hiệu chuẩn dương và mẫu dương tính từ xanh dương sang vàng.
12	Đo cường độ màu dung dịch mỗi giếng ở bước sóng nm ở bước sóng 450 nm (đọc) và ở 620- 630 nm tham chiếu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Tính giá trị ngưỡng:

Kết quả xét nghiệm được tính bởi trung bình của giá trị ngưỡng được xác định với công thức như sau trên giá trị trung bình OD450 nm của chứng âm (NC):

$$NC + 0.250 = \text{Ngưỡng (Co)}$$

Kết quả xét nghiệm được giải thích bằng tỷ lệ của mẫu giá OD450nm (S) và giá trị ngưỡng (Co), hay S/Co, như bảng sau:

S/Co	Kết luận
< 0.9	Âm tính
0.9 – 1.1	Nghi ngờ
> 1.1	Dương tính

Kết quả âm tính cho thấy bệnh nhân không hình thành kháng thể IgM kháng ZIKV.

Kết quả dương tính cho thấy nhiễm ZIKV.

- Làm lại xét nghiệm khi kết quả ở mức ngưỡng nghi ngờ (grey zone), không xác định được kết quả âm tính hoặc dương tính. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Mẫu bị nhiễm khuẩn hoặc bị bất hoạt bởi nhiệt, mẫu bảo quản không đúng cách đã đông quá nhiều lần.
- Nhiễm chéo từ giếng nọ sang giếng kia do kỹ thuật nhỏ pipet chưa thành thạo
- Các bước rửa không sạch do thấm chưa khô.
- Mẫu tán huyết ("màu đỏ") và mỡ cao ("màu sữa") phải được loại bỏ vì chúng có thể tạo ra kết quả sai. Các mẫu có chứa sợi fibrin, cặn, chất xơ và xác vi khuẩn cần được loại bỏ vì chúng có thể làm tăng khả năng làm sai kết quả
- Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng. Tuân thủ quy trình lấy mẫu và bảo quản mẫu. Người thực hiện phải thành thạo kỹ thuật.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
- Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

50. *Zika virus* IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và bán định lượng kháng thể IgG kháng Virus Zika trong huyết thanh và huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

Ví dụ: Bộ sinh phẩm Zikv IgG (VD hoặc tương đương)

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiết trùng
- Ống Falcon 5-15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm

- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ: Bộ sinh phẩm Zikv IgG (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng mẫu 1:101 vào các ống pha loãng đã định. Không pha loãng chất chứng. Trộn cẩn thận tất cả các thành phần chất lỏng vào và lắc đều.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Cho 100 µl chất chứng âm (3 giếng), 100 µl chứng dương (2 giếng), 100 µl chứng dương cao (2 giếng) và 100 µl mẫu pha loãng vào mỗi giếng đã định. Giếng A1 để trống.
7	Đậy tấm và ủ 60 phút ở +37°C
8	Rửa phiến nhựa.
9	Chuẩn bị chất cộng hợp
10	Cho 100 µl cộng hợp vào các giếng (trừ giếng trống)
11	Đậy tấm và ủ 60 phút ở +37°C
12	Rửa phiến nhựa
13	Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ phiến nhựa ở nhiệt độ phòng (18-24°C) trong 20 phút, không đậy tấm và tránh ánh sáng.
15	Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng
16	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 20 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Trong phân tích định tính tính toán giá trị ngưỡng (CO) từ chứng Dương vừa (MPC) theo công thức sau:

$$\text{Trung bình OD450nm MPC} / 2 = \text{CO}$$

Kết quả dựa vào tỷ lệ của mẫu OD450nm và giá trị ngưỡng (hay S/CO) như sau:

- S/CO < 0.9 : Âm tính
- S/CO : 0.9- 1.1: Nghi ngờ → Cần xét nghiệm lần 2. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định.
- S/CO > 1,1: Dương tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.

51. Mump Virus IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Tài liệu này hướng dẫn thực hiện quy trình xét nghiệm phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgM đối với virus Quai bị (Mump Virus) trong huyết thanh hoặc huyết tương người. Xét nghiệm ELISA classic Mump Virus IgM khuyến cáo để xác định nhiễm virus cấp bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- + Mump Virus IgM: Kháng thể IgM với Mump Virus
- + Mump Virus IgG: Kháng thể IgG với Mump Virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm ELISA Classic Mump Virus IgG/IgM (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Ống Falcon 5-15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm ELISA Classic Mump Virus IgG/IgM (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Đối với IgM cần làm thêm: Hấp phụ yếu tố thấp: (pha Rf-absorbent RF (V1) + dilution buffer DILB (V2) = 1 + 4 = Rf-dilution bufer (V3) (200 µl Rf-absorbent RF + 800 µl dilution buffer DILB); pha loãng bệnh phẩm V4+V3 = 1+100 (10 µl bệnh phẩm + 1000 µl Rf-dilution bufer yếu tố thấp đã pha). Ủ bệnh phẩm đã xử lý trên 15 phút ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2.
5	Ủ 60 phút (±5 phút) ở 37°C (± 1°C) trong tủ ấm.
6	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
7	Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank.
8	Ủ 30 phút (±1 phút) ở 37°C(± 1°C) trong tủ ấm.
9	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
10	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank
11	Ủ 30 phút (±1 phút) ở 37°C(± 1°C) trong tủ ấm.

12	Nhỏ 100 μ l dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tấm.
13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút bằng máy đọc ELISA.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC

Giá trị các chứng và chuẩn nằm trong giới hạn cho phép đã được chứng nhận kèm theo lô sản phẩm. Nếu giá trị này nằm ngoài khoảng thì cần tiến hành xét nghiệm lại.

Mẫu trắng blank < 0.25 OD

Chứng âm phải âm tính.

Sử dụng bảng để tính giá trị dao động trong khoảng cho phép của mẫu chuẩn SD standard serum đối với từng lô.

OD của standard serum và cut off serum không được chênh quá 20%.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

* Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

- Kết quả > giá trị ngưỡng: Dương tính
- Kết quả < giá trị ngưỡng: Âm tính
- Kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định..

IgM xuất hiện trong nhiễm Quai bị cấp thậm chí khi không có các triệu chứng. Trường hợp âm tính không loại trừ khả năng nhiễm virus vì kháng thể đặc hiệu chỉ xuất hiện sau 3 đến 6 ngày sau khi có các triệu chứng bệnh. Các phản ứng chéo có thể giữa các tác nhân gây bệnh khác trong họ Paramyxoviridae.

* Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

- Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ số tỷ lệ pha loãng.
- Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng.

* Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường:

Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
- Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

52. Mump Virus IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgG đối với virus Quai bị (Mump Virus) trong huyết thanh hoặc huyết tương người. Xét nghiệm ELISA classic Mump Virus IgG khuyến cáo để xác định trạng thái miễn dịch và xác định IgG trong dịch não tủy bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- + Mump Virus IgM: Kháng thể IgM với Mump Virus
- + Mump Virus IgG: Kháng thể IgG với Mump Virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm ELISA Mump Virus IgG (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 5-15 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm ELISA Mump Virus IgG (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng (đối với IgG: 1 bệnh phẩm +100 dilution buffer DILB) vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2
5	Ủ 60 phút (± 5 phút) ở 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) trong tủ ấm.
6	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
7	Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank.
8	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) trong tủ ấm.
9	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
10	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank
11	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) trong tủ ấm.
12	Nhỏ 100µl dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tấm.

13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút bằng máy đọc ELISA.
----	---

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu.
- Giá trị các chứng và chuẩn nằm trong giới hạn cho phép đã được chứng nhận kèm theo lô sản phẩm. Nếu giá trị này nằm ngoài khoảng thì cần tiến hành xét nghiệm lại.
 - + Mẫu trắng blank < 0.25 OD
 - + Chứng âm phải âm tính.
 - + Sử dụng bảng để tính giá trị dao động trong khoảng cho phép của mẫu chuẩn SD standard serum đối với từng lô.
 - + OD của standard serum và cut off serum không được chênh quá 20%.
 - + Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

* Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

- Kết quả > giá trị ngưỡng: Dương tính
- Kết quả < giá trị ngưỡng: Âm tính
- Kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định.

IgG: Trong trường hợp không có nhiễm trùng cấp, IgG chỉ điểm đã từng có nhiễm virus trước đó hoặc đã từng tiêm vắc xin

* Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ số tỷ lệ pha loãng.

Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng.

Đối với dịch não tủy cần tiến hành lấy cùng ngày với mẫu máu và thực hiện xét nghiệm song song đồng thời.

* Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
- Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

53. Chikungunya virus IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể IgM kháng Chikungunya trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgM kháng Chikungunya dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm Chikungunya IgM ELISA Kit
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm

- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	- Chuẩn bị đủ số giếng cần sử dụng.
2	- Pha dung dịch rửa: Pha dung dịch rửa bằng nước cất với tỷ lệ 1 dung dịch rửa + 19 nước cất.
3	- Lọ kháng nguyên Chikungunya đông khô được hoàn nguyên bằng 1ml dung dịch nước rửa.
4	- Cho 50 µl chứng thấp, chứng chuẩn, chứng cao hoặc bệnh phẩm vào các giếng tương ứng. (Giếng A1 là giếng trống). Đậy nắp.
5	- Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 60 ± 5 phút
6	- Cho 50µl dung dịch kháng nguyên đã hoàn nguyên vào các giếng (trừ giếng trống). Đậy nắp.
7	- Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng
8	- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Thấm khô.
9	- Cho 50 µl dung dịch kháng thể vào các giếng (trừ giếng trống). Đậy nắp.
10	- Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng
11	- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Thấm khô.
12	- Cho 50 µl dung dịch cộng hợp Streptavidin peroxidase vào các giếng (trừ giếng trống). Đậy nắp.
13	- Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng
14	- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Thấm khô.
15	- Cho vào mỗi giếng 100 µl TMB.
16	- Để ở nhiệt độ phòng đúng 15 phút, tránh ánh sáng.
17	- Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.
18	- Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450/620 nm trong vòng 30 sau khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng
19	- Để ở nhiệt độ phòng đúng 15 phút, tránh ánh sáng.
20	- Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

21	- Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450/620 nm trong vòng 30 sau khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng
----	---

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Tính độ hấp phụ trung bình cho mỗi mẫu chứng âm và chứng dương. Thử nghiệm có giá trị khi thỏa mãn điều kiện:

+ Giếng trống < 0.1

+ Chứng thấp < chứng chuẩn < chứng cao

+ Giá trị hấp thụ chứng chuẩn trong khoảng 0.150 - 1.300

- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

a. Tính giá trị ngưỡng

- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (CO):

$$OD\ CO = (OD\ CO1 + OD\ CO2)/2$$

CO1: Giá trị chứng chuẩn 1

CO2: Giá trị chứng chuẩn 2

- Tính tỉ số mẫu: Tỉ số mẫu = giá trị OD của mẫu x 10 / giá trị ngưỡng

b. Diễn giải kết quả

- Nếu tỉ số < 9: mẫu thử thấp.
- Nếu $9 \leq \text{tỉ số} \leq 11$: mẫu thử cần phải xét nghiệm lại. Nên thử sau 2-4 tuần. Nếu kết quả vẫn là $9 \leq \text{tỉ số} \leq 11$ thì kết luận mẫu thử thấp.
- Nếu tỉ số > 11: mẫu thử cao.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

- Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
- Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

ngoctlv.kcb - Truong Le Van Ngoc - 04/09/2023 - 16:23:00

54. Chikungunia virus IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng Chikungunya trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: Chikungunia IgG: Kháng thể IgG kháng Chikungunia virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm Chikungunya IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Ống Falcon 5-15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml

- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy miễn dịch bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm Chikungunya IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Pha dung dịch rửa: Pha dung dịch rửa bằng nước cất với tỷ lệ 1 dung dịch rửa + 19 nước cất.
4	- Lọ kháng nguyên Chikungunya đông khô được hoàn nguyên bằng 1ml dung dịch nước rửa.
5	- Pha loãng mẫu theo tỷ lệ 1:100 dung dịch pha loãng (10µl mẫu + 1ml dung dịch pha loãng)
6	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
7	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
8	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
9	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào máy + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào máy và chọn test sử dụng.
10	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình.
10.1	Cho 50 µl chứng thấp, chứng chuẩn, chứng cao hoặc bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng tương ứng.(Giếng A1 là giếng trống).
10.2	Ủ ở 37 °C ± 1°C trong 60 ± 5 phút
10.3	Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa 300µl/giếng. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Thấm khô.

Các bước	Nội dung
10.4	Cho 50 μ l dung dịch kháng nguyên đã hoàn nguyên vào các giếng (trừ giếng trống). Đậy nắp.
10.5	Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (18 -24 độ)
10.6	Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Thấm khô.
10.7	Cho 50 μ l dung dịch kháng thể vào các giếng (trừ giếng trống). Đậy nắp.
10.8	Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (18 -24 độ)
10.9	Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Thấm khô.
10.10	Cho 50 μ l dung dịch cộng hợp Streptavidin peroxidase vào các giếng (trừ giếng trống). Đậy nắp.
10.11	Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (18 -24 độ)
10.12	Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Thấm khô.
10.13	Cho vào mỗi giếng 100 μ l TMB.
10.14	Đề ở nhiệt độ phòng đúng 15 phút, tránh ánh sáng.
10.15	Cho 100 μ l dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.
10.16	Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450/620 nm trong vòng 30 sau khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng
11	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
12	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tẩy ra sau khi chạy máy xong.
13	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
14	Tắt máy tính.
15	Tắt máy hệ thống Elisa bán tự động.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Xem xét kết quả nội kiểm (QC). Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

- Nếu tỉ số < 9: Âm tính.

- Nếu $9 \leq \text{tỉ số} \leq 11$: nghi ngờ $\rightarrow$ mẫu thử cần phải xét nghiệm lại. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định. Nên thử lại sau 2-4 tuần. Nếu kết quả vẫn là $9 \leq \text{tỉ số} \leq 11$ thì kết luận mẫu thử Âm tính
- Nếu tỉ số > 11 : Dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
- Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

55. SARS-CoV-2 IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgG người có trong huyết thanh hoặc huyết tương hướng vào vùng S1 của spike protein của SARS-CoV-2. Xét nghiệm SARS-CoV-2 S1 IgG hỗ trợ phát hiện IgG giúp cho việc xác nhận có tiếp xúc với mầm bệnh và hỗ trợ xác định tình trạng miễn dịch bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- CAL A (Calibrator A) : Chất hiệu chuẩn A
- CAL B (Calibrator B) : Chất hiệu chuẩn B
- CAL C (Calibrator C) : Chất hiệu chuẩn C
- CAL D (Calibrator D) : Chất hiệu chuẩn D

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm SARS-CoV-2 S1 IgG (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng microplate
- Ống Falcon 15ml

- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml, 1000 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm SARS-CoV-2 S1 IgG (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng 1:50 với nước cất trước khi sử dụng.
4	Chuẩn bị dung dịch đệm mẫu: Pha loãng 1:5 với nước cất trước khi sử dụng
5	Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1:101 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ.
6	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
7	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất hiệu chuẩn, chất chứng và mẫu. Đề giếng A1 đến D1 là giếng cho chất chuẩn từ A đến D, giếng E1 là chứng âm, giếng F1 là chứng dương. Cho 100 µl chất hiệu chuẩn A đến D (4 giếng), 100 µl chất chứng (2 giếng) và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định.
8	Đậy nắp và ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C
9	Rửa phiến nhựa.
10	Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng
11	Đậy nắp và ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C
12	Rửa phiến nhựa.
13	Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng

14	Không cấy tẩm, ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C, tránh tiếp xúc với ánh sáng mạnh
15	Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, ủ trong 5 phút sau đó lắc kỹ tẩm trong 5 giây
16	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Đánh giá định lượng

- Kết quả định lượng được xác định dựa trên đường chuẩn. Các tín hiệu đo quang học (OD) của các chất chuẩn được vẽ đồ thị dựa trên hoạt tính kháng thể của chúng (tính bằng IU/ml hoặc U/ml). Hoạt tính kháng thể của chuẩn được cung cấp trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng cụ thể theo lô được cung cấp cùng với bộ xét nghiệm.
- Phạm vi nghi ngờ:
 - Phạm vi nghi ngờ được chỉ định trên các chứng chỉ kiểm tra chất lượng được cung cấp cùng với bộ xét nghiệm và cho biết phạm vi kết quả xét nghiệm ở khoảng nghi ngờ.
 - Các giá trị dưới phạm vi nghi ngờ → kết quả xét nghiệm âm tính;
 - Các giá trị trên phạm vi nghi ngờ → kết quả xét nghiệm dương tính.
- Phạm vi đo: Phạm vi đo được ghi rõ trên chứng chỉ kiểm tra chất lượng được cung cấp cùng với bộ xét nghiệm.
 - Các mẫu có kết quả thử nghiệm cao hơn giới hạn định lượng trên phải được báo cáo là > giá trị tối đa. Trong trường hợp mẫu bệnh phẩm cho kết quả xét nghiệm cao hơn giới hạn định lượng trên, mẫu đó có thể được thử nghiệm ở độ pha loãng cao hơn. Hoạt tính kháng thể thu được sau đó phải được nhân với hệ số pha loãng bổ sung.
 - Các mẫu có kết quả xét nghiệm thấp hơn giới hạn định lượng dưới phải được báo cáo là < giá trị tối thiểu.

Đánh giá định tính

Kết quả được tính toán bằng cách so sánh tín hiệu đo quang học (OD) của mẫu bệnh nhân với tín hiệu đo quang trung bình của mẫu hiệu chuẩn B (mẫu chuẩn ngưỡng CAL B) được thử nghiệm hai lần. (OD TB CAL B).

- Nếu mẫu của bệnh nhân có giá trị OD = OD trung bình CAL B $\pm$ 20% $\rightarrow$ mẫu được coi là nghi ngờ $\rightarrow$ cần thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ $\rightarrow$ đánh giá là: Không xác định.
- Các mẫu có giá trị OD cao hơn OD trung bình CAL B trên 20% $\rightarrow$ được đánh giá là: Dương tính.
- Các mẫu có giá trị OD thấp hơn OD trung bình CAL B dưới 20% $\rightarrow$ được đánh giá là: Âm tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
- Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

56. SARS-CoV-2 IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgM người có trong huyết thanh hoặc huyết tương hướng vào vùng S1 của spike protein của SARS-CoV-2. Xét nghiệm SARS-CoV-2 S1 IgM hỗ trợ phát hiện các bệnh nhiễm trùng cấp tính bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- CAL A (Calibrator A) : Chất hiệu chuẩn A
- CAL B (Calibrator B) : Chất hiệu chuẩn B
- CAL C (Calibrator C) : Chất hiệu chuẩn C
- CAL D (Calibrator D) : Chất hiệu chuẩn D

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm SARS-CoV-2 S1 IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Ống Falcon 15ml
- Khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml, 1000 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm SARS-CoV-2 S1 IgM (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng 1:50 với nước cất trước khi sử dụng.
4	Chuẩn bị dung dịch đệm mẫu: Pha loãng 1:5 với nước cất trước khi sử dụng
5	Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1:101 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ.
6	Hấp thu trước các yếu tố dạng thấp (Rf) bằng cách pha loãng mẫu của bệnh nhân trong dung dịch đệm pha loãng 1x của xét nghiệm miễn dịch IgM và ủ sau đó trong tối thiểu 15 phút ở nhiệt độ phòng.
7	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
8	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất hiệu chuẩn, chất chứng và mẫu. Đề giếng A1 đến D1 là giếng cho chất chuẩn từ A đến D, giếng E1 là chứng âm, giếng F1 là chứng dương. Cho 100 µl chất hiệu chuẩn A đến D (4 giếng), 100 µl chất chứng (2 giếng) và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định.
9	Đậy nắp và ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C
10	Rửa phiên nhựa.
11	Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng
12	Đậy nắp và ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C
13	Rửa phiên nhựa.
14	Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng

Các bước	Nội dung
15	Không đậy tấm, ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C, tránh tiếp xúc với ánh sáng mạnh
16	Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, ủ trong 5 phút sau đó lắc kỹ tấm trong 5 giây
17	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Đánh giá định lượng

- Kết quả định lượng được xác định dựa trên đường chuẩn. Các tín hiệu đo quang học (OD) của các chất chuẩn được vẽ đồ thị dựa trên hoạt tính kháng thể của chúng (tính bằng IU/ml hoặc U/ml). Hoạt tính kháng thể của chuẩn được cung cấp trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng cụ thể theo lô được cung cấp cùng với bộ xét nghiệm.
- Phạm vi nghi ngờ:
 - Phạm vi nghi ngờ được chỉ định trên các chứng chỉ kiểm tra chất lượng được cung cấp cùng với bộ xét nghiệm và cho biết phạm vi kết quả xét nghiệm ở khoảng nghi ngờ.
 - Các giá trị dưới phạm vi nghi ngờ → kết quả xét nghiệm âm tính;
 - Các giá trị trên phạm vi nghi ngờ → kết quả xét nghiệm dương tính.
- Phạm vi đo: Phạm vi đo được ghi rõ trên chứng chỉ kiểm tra chất lượng được cung cấp cùng với bộ xét nghiệm.
 - Các mẫu có kết quả thử nghiệm cao hơn giới hạn định lượng trên phải được báo cáo là > giá trị tối đa. Trong trường hợp mẫu bệnh phẩm cho kết quả xét nghiệm cao hơn giới hạn định lượng trên, mẫu đó có thể được thử nghiệm ở độ pha loãng cao hơn. Hoạt tính kháng thể thu được sau đó phải được nhân với hệ số pha loãng bổ sung.
 - Các mẫu có kết quả xét nghiệm thấp hơn giới hạn định lượng dưới phải được báo cáo là < giá trị tối thiểu.

Đánh giá định tính

Kết quả được tính toán bằng cách so sánh tín hiệu đo quang học (OD) của mẫu bệnh nhân với tín hiệu đo quang trung bình của mẫu hiệu chuẩn B (mẫu chuẩn ngưỡng CAL B) được thử nghiệm hai lần. (OD TB CAL B).

- Nếu mẫu của bệnh nhân có giá trị OD = OD trung bình CAL B $\pm$ 20% $\rightarrow$ mẫu được coi là nghi ngờ $\rightarrow$ cần thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ $\rightarrow$ đánh giá là: Không xác định.
- Các mẫu có giá trị OD cao hơn OD trung bình CAL B trên 20% $\rightarrow$ được đánh giá là: Dương tính.
- Các mẫu có giá trị OD thấp hơn OD trung bình CAL B dưới 20% $\rightarrow$ được đánh giá là: Âm tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

57. Influenza IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng vi rút Influenza trong huyết thanh/huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng vi rút Influenza
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng vi rút Influenza sẽ kết hợp với các kháng nguyên của vi rút Influenza được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng vi rút Influenza bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng(pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) 10µl -200 µl tiệt trùng
- Đầu côn (tip) 1000 µl tiệt trùng
- Ống nghiệm nhựa 3-5ml không nắp
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Chai thủy tinh Duran

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y/hộ lý (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA bán tự động bao gồm:
 - + Máy ủ (khoảng nhiệt độ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$),
 - + Máy rửa khay vi giếng 8 x 12 hàng
 - + Máy đọc, bước sóng 405nm – 630nm
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy vortex để trộn các hoá chất, và trộn đều mẫu khi pha loãng
- Bộ pipette tự động các kích cỡ từ 10 μl đến 1000 μl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.4 Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố $< 2.0 \text{ g/L}$, lipid/triglyceride $< 11.5 \text{ g/L}$, bilirubin $< 0.201 \text{ g/L}$
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất xuất và quy trình của phòng xét nghiệm

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số sinh phẩm cần thực hiện gắn vào giá đỡ
5	Pha loãng bệnh phẩm
6	Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng
7	Đậy và ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp
8	Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa
9	Nhỏ dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzyme) vào các giếng
10	Đậy và ủ giếng lần thứ hai
11	Rửa giếng
12	Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng
13	Ủ giếng lần thứ 3 (lưu ý tránh ánh sáng)
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng
16	Nhập kết quả đo được vào phần mềm tính toán theo hướng dẫn của nhà sản xuất
17	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Tắc kim máy rửa, dẫn đến rửa bẩn. - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Máy ủ không đạt nhiệt độ yêu cầu. + Máy đo quang bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin

SAI SÓT	XỬ TRÍ
	để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

58. Influenza IgA miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgA kháng vi rút Influenza trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgA kháng vi rút Influenza
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgA kháng vi rút Influenza sẽ kết hợp với các kháng nguyên của vi rút Influenza được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgA gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgA kháng Influenza bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) 10µl -200 µl tiệt trùng
- Đầu côn (tip) 1000 µl tiệt trùng
- Ống nghiệm nhựa 3-5ml không nắp
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Chai thuỷ tinh Duran

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA bán tự động bao gồm:
 - + Máy ủ (khoảng nhiệt độ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$),
 - + Máy rửa khay vi giếng 8 x 12 hàng
 - + Máy đọc, bước sóng 405nm – 630nm
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy vortex để trộn các hoá chất, và trộn đều mẫu khi pha loãng
- Bộ pipette tự động các kích cỡ từ 10 μl đến 1000 μl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.4 Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố $< 2.0 \text{ g/L}$, lipid/triglyceride $< 11.5 \text{ g/L}$, bilirubin $< 0.201 \text{ g/L}$
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất xuất và quy trình của phòng xét nghiệm

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số sinh phẩm cần thực hiện gắn vào giá đỡ
5	Pha loãng bệnh phẩm
6	Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng
7	Đậy và ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp
8	Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa
9	Nhỏ dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzyme) vào các giếng
10	Đậy và ủ giếng lần thứ hai
11	Rửa giếng
12	Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng
13	Ủ giếng lần thứ 3 (lưu ý tránh ánh sáng)
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng
16	Nhập kết quả đo được vào phần mềm tính toán theo hướng dẫn của nhà sản xuất
17	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoạch Âm tính
 - + Hoạch Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Tắc kim máy rửa, dẫn đến rửa bẩn. - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Máy ủ không đạt nhiệt độ yêu cầu. + Máy đo quang bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin

	để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp
--	---

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

59. VZV IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgM đối với virus Thủy đậu (Varicella-Zoster Virus) trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- VZV IgM (Varicella-Zoster Virus IgM): Kháng thể IgM với Varicella-Zoster Virus
- QC: Quality Control - Mẫu chứng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm Varicella-Zoster Virus IgG/IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2 oC – 8oC
- Tủ lạnh âm sâu -20oC
- Tủ lạnh âm sâu -70oC
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khẩn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm ELISA *Varicella-Zoster Virus* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Đối với IgM cần làm thêm: Hấp phụ yếu tố thấp: (pha Rf-absorbent RF (V1) + dilution buffer DILB (V2) = 1 + 4 = Rf-dilution bufer (V3) (200 µl Rf-absorbent RF + 800 µl dilution buffer DILB); pha loãng bệnh phẩm V4+V3 = 1+100 (10 µl bệnh phẩm + 1000 µl Rf-dilution bufer yếu tố thấp đã pha). Ủ bệnh phẩm đã xử lý trên 15 phút ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2.
5	Ủ 60 phút (±5 phút) ở 37°C (± 1°C) trong tủ ấm.
6	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
7	Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank.

Các bước	Nội dung
8	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở $37^{\circ}\text{C}(\pm 1^{\circ}\text{C})$ trong tủ ấm.
9	Rửa tấm 4 lần với $300\mu\text{l}$ /giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
10	Nhỏ $100\mu\text{l}$ dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank
11	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở $37^{\circ}\text{C}(\pm 1^{\circ}\text{C})$ trong tủ ấm.
12	Nhỏ $100\mu\text{l}$ dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tấm.
13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút bằng máy đọc ELISA.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*

Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*

NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC

Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng

Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

+ Âm tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm < Khoảng giá trị ngưỡng.

+ Dương tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm > Khoảng giá trị ngưỡng.

IgM xuất hiện trong nhiễm Thủy đậu cấp hoặc virus tái hoạt động.

Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ số tỷ lệ pha loãng.

Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

60. VZV IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgG đối với virus Thủy đậu (Varicella-Zoster Virus) trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- VZV IgG (Varicella-Zoster Virus IgG): Kháng thể IgG với Varicella-Zoster Virus.
- QC: Quality Control - Mẫu chứng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm Varicella-Zoster Virus IgG/IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút âm
- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Varicella-Zoster Virus* IgG/IgM (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng (đối với IgG: 1 bệnh phẩm +100 dilution buffer DILB) vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2
5	Ủ 60 phút (± 5 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
6	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
7	Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank.
8	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
9	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
10	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank
11	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
12	Nhỏ 100µl dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tấm.

13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút bằng máy đọc ELISA.
----	---

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

- Xem xét kết quả QC:

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*

Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*

NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC

Qui trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng

Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

+ Âm tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm < Khoảng giá trị ngưỡng.

+ Dương tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm > Khoảng giá trị ngưỡng.

Các phản ứng chéo có thể giữa các tác nhân gây bệnh khác như HSV, CMV, EBV bị ảnh hưởng trong đáp ứng IgG.

IgG: Trong trường hợp không có nhiễm trùng cấp, IgG chỉ điểm đã từng có nhiễm virus trước đó hoặc đã từng tiêm vắc xin

Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ số tỷ lệ pha loãng.

Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

61. Parvovirus B19 IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định định tính kháng thể IgM kháng Parvovirus B19 trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA. Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: Parvovirus B19 IgM: Kháng thể IgM kháng Parvovirus B19.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm ELISA Parvovirus B19 IgM
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Đàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Xử lý trước mẫu với chất hấp thụ yếu tố dạng thấp (RF) trước khi phát hiện IgM.
7	Cho chứng (1 giếng trống, 1 chứng âm, 2 giếng chuẩn) và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình.
8	Đậy tấm và ủ.
9	Rửa phiến nhựa.
10	Chuẩn bị chất cộng hợp
11	Đậy tấm và ủ
12	Rửa phiến nhựa
13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ phiến nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng
15	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
16	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 405 và 650nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt các yêu cầu:

- OD giếng trống phải < 0.25
- Chứng âm phải cho kết quả âm tính.
- Giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình của huyết thanh chuẩn ngưỡng phải trong khoảng hợp lệ ghi trong Giấy kiểm tra chất lượng bộ kit (Sau khi trừ đi độ hấp thụ của giếng trắng).
- Sự dao động giá trị OD của huyết thanh chuẩn không được cao hơn 20%.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Sử dụng phần mềm tính toán tự động tín hiệu quang học đo được. Có thể sử dụng các phần mềm sau do nhà sản xuất cung cấp dựa trên Microsoft® Excel®.
- Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.

- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

62. Parvovirus B19 IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định định tính kháng thể IgG kháng Parvovirus B19 trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA. Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: Parvovirus B19 IgG: Kháng thể IgG kháng Parvovirus B19

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm ELISA Parvovirus B19 IgG
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Đàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Xử lý trước mẫu với chất hấp thụ yếu tố dạng thấp (RF) trước khi phát hiện IgM.
7	Cho chứng (1 giếng trống, 1 chứng âm, 2 giếng chuẩn) và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình.
8	Đậy tấm và ủ.
9	Rửa phiến nhựa.
10	Chuẩn bị chất cộng hợp
11	Đậy tấm và ủ
12	Rửa phiến nhựa
13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ phiến nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng
15	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
16	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 405 và 650nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt các yêu cầu:

- OD giếng trống phải < 0.25
- Chứng âm phải cho kết quả âm tính.
- Giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình của huyết thanh chuẩn ngưỡng phải trong khoảng hợp lệ ghi trong Giấy kiểm tra chất lượng bộ kit (Sau khi trừ đi độ hấp thụ của giếng trắng).
- Sự dao động giá trị OD của huyết thanh chuẩn không được cao hơn 20%.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Sử dụng phần mềm tính toán tự động tín hiệu quang học đo được. Có thể sử dụng các phần mềm do nhà sản xuất cung cấp dựa trên Microsoft® Excel®.
- Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.

- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

63. Virus Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể (Ab) kháng virus trong mẫu bệnh phẩm của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Nguyên lý: Bằng kỹ thuật CMIA gián tiếp (VD hoặc nguyên lý tương đương).
- Định nghĩa
 - + Calibrators: Mẫu chuẩn.
 - + Controls: Mẫu chứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút (1 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất, sinh phẩm xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Vào Reagent để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn: + Nếu tại vị trí có ô xét nghiệm cần thực hiện hiển thị dòng chữ no cal có nghĩa đó là lô thuốc thử mới cần phải hiệu chuẩn. + Khi chạy chứng thấy kết quả vượt ra ngoài dải giới hạn cho phép.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên (nếu thấy cần thiết) thì tiến hành chạy chứng.
4	Chạy mẫu theo các bước sau
4.1	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 4.2 – 4.9:	
4.2	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm.
4.3	Hút huyết thanh/huyết tương vào cốc đựng mẫu tương ứng.
4.4	Vào màn hình thao tác theo hướng dẫn của nhà sản xuất
4.5	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
4.6	Chọn test cần thực hiện
4.7	Chọn Sample details để nhập thêm thông tin bệnh nhân (nếu cần)
4.8	Nhấn ADD ORDER (F3) .
4.9	Đưa khay mẫu vào khu nạp giá mẫu ở vị trí chạy mẫu bệnh nhân thường quy.
4.10	Khởi động chạy RUN - Trên màn hình chính, chọn SH & PM Nhấn RUN (F8)
Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 4.10 – 4.12:	
4.10	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm quản lý thông tin phòng xét nghiệm
4.11	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack quy định, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
4.12	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC.

4.2.2 Đọc kết quả:

a. Tính giá trị ngưỡng:

- ✓ Máy sẽ tự động tính giá trị trung bình tín hiệu hóa phát quang Mẫu chuẩn qua ba lần chạy lặp lại và lưu kết quả.
- ✓ Kết quả xét nghiệm được tính kết quả dựa trên S/CO:
 - Tính giá trị ngưỡng: Ngưỡng RLU = Giá trị trung bình RLU của Calibrator 1 x 0,074
 - $S/CO = RLU \text{ mẫu} / RLU \text{ ngưỡng}$
 - Cut-off (CO) = Giá trị trung bình của các cut-off

b. Diễn giải kết quả

Kết quả được diễn giải như bảng dưới đây:

Kết quả ban đầu (S/CO)	Diễn giải trên thiết bị	Quy trình xét nghiệm lại
< 1,00	KHÔNG PHẢN ỨNG	Không cần thực hiện lại xét nghiệm
$\geq 1,00$	PHẢN ỨNG	Xét nghiệm lại lần hai (nếu cần)

- Tất cả những mẫu bệnh phẩm sau khi kiểm tra lại lần 2:
 - + Nếu $S/CO < 1$ thì kết luận âm tính.
 - + Nếu $S/CO \geq 1$ giống như lần đầu thì kết luận dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:
 - + Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.
 - + Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Xử trí:
 - + Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
 - + Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
 - + Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

64. Zika virus IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus Zika trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: Zika IgM: Kháng thể IgM kháng Zika virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm Zika IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate4
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiem

- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C– 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm Zika IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i> Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Zika virus IgM trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients.

	Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Zika virus IgM bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Pha loãng mẫu theo tỷ lệ 1:101 Hút 50 µl thuốc thử trung hòa vào các giếng (trừ giếng trắng) Hút 100 µl chất chứng âm lặp lại ba lần, 100 µl chứng dương một lần vào giếng chứng 100 µl mẫu pha loãng vào mỗi giếng mẫu Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 60 ± 5 phút Rửa 4-5 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm 20 -30 giây giữa mỗi lần rửa Cho 100 µl chất liên hợp enzyme vào mỗi giếng, trừ giếng trắng Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 60 ± 5 phút Rửa 4-5 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm 20 -30 giây giữa mỗi lần rửa Hút 100 µl hỗn hợp chất tạo màu/cơ chất vào mỗi giếng, gồm cả giếng trắng Ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng (18 – 24 độ) Cho 100µl Axit Sulphuric vào trong giếng Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450/620 nm
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình

10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tẩm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

* Tính giá trị ngưỡng:

- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (CO) từ giá trị trung bình của chứng âm

$$NC + 0.250 = \text{Ngưỡng (CO)}$$

NC: Giá trị trung bình của chứng âm

- Tính tỉ số mẫu: Tỉ số mẫu = giá trị OD của mẫu / giá trị ngưỡng (CO)

* Diễn giải kết quả

- Nếu tỉ số < 0.9: Âm tính.
- Nếu tỉ số từ 0.9 – 1.1: nghi ngờ → mẫu thử cần phải xét nghiệm lại. Nếu vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định. Nên thử lại sau 2-4 tuần.
- Nếu tỉ số > 1.1: Dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

65. Zika virus IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng virus Zika trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: Zika IgG: Kháng thể IgG kháng Zika virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm Zika IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm Zika IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i>

Các bước	Nội dung
	Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Zika</i> virus IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Zika</i> virus IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Pha loãng mẫu theo tỷ lệ 1:101 Hút 100 µl chất chứng âm lặp lại ba lần, 100 µl chứng dương một lần vào giếng chứng 100 µl mẫu pha loãng vào mỗi giếng mẫu Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 60 ± 5 phút Rửa 4-5 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm 20 -30 giây giữa mỗi lần rửa Cho 100 µl chất liên hợp enzyme vào mỗi giếng, trừ giếng trắng Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 60 ± 5 phút Rửa 4-5 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm 20 -30 giây giữa mỗi lần rửa Hút 100 µl hỗn hợp chất tạo màu/cơ chất vào mỗi giếng, gồm cả giếng trắng

Các bước	Nội dung
	Ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng (18 – 24 độ) Cho 100µl Axit Sulphuric vào trong giếng Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450/620 nm
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Phân tích định tính:

Tính giá trị ngưỡng:

- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (CO) từ giá trị đo chứng dương vừa

$$OD\ CO = (OD\ CO1 + OD\ CO2)/2$$

CO1: Giá trị chứng dương vừa 1

CO2: Giá trị chứng dương vừa 2

- Tính tỉ số mẫu: Tỉ số mẫu = giá trị OD của mẫu / giá trị ngưỡng

Diễn giải kết quả

- Nếu tỉ số < 0.9: Âm tính.
- Nếu $0.9 \leq \text{tỉ số} \leq 1.1$: Nghi ngờ → mẫu thử cần phải xét nghiệm lại. Nếu vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định. Nên thử lại sau 2-4 tuần. Nếu kết quả vẫn là $0.9 \leq \text{tỉ số} \leq 1.1$ thì kết luận mẫu thử Âm tính
- Nếu tỉ số > 1.1: Dương tính.

Phân tích bán định lượng:

Trong bán định lượng, sử dụng chất chứng ArbU/ml để vẽ đường cong hiệu chuẩn nổi điểm và sau đó biểu thị kết quả ở ArbU/ml.

- Mẫu thể hiện ArbU/ml < 9: Âm tính
- Mẫu thể hiện ArbU/ml: $9 \leq \text{Mẫu} \leq 11$: mẫu thử cần phải xét nghiệm lại. Nên thử sau 2-4 tuần
- Mẫu thể hiện > 11: Dương tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

66. Parvo virus B19 IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định định tính kháng thể IgM kháng Parvovirus B19 trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: Parvovirus B19 IgM: Kháng thể IgM kháng Parvovirus B19.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm ELISA *classic* Parvovirus B19 IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm ELISA *classic* Parvovirus B19 IgM (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Xử lý trước mẫu với chất hấp thụ yếu tố dạng thấp (RF) trước khi phát hiện IgM
4	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
5	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
6	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
7	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
8	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i> Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Parvovirus B19 IgM trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp.

Các bước	Nội dung
	Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Parvovirus B19 IgM bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
9	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Cho 100 µl bệnh phẩm pha loãng, chứng vào các giếng tương ứng Ủ ở 37°C(±1) trong 60 phút((±5) Rửa 3-4 lần bằng dung dịch rửa Cho 100 µl dung dịch cộng hợp Ủ ở 37°C(±1) trong 30 phút((±5) Rửa 3-4 lần bằng dung dịch rửa Cho vào mỗi giếng 100 µl dung dịch hiện màu Ủ ở 37°C(±1) trong 30 phút((±5) Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng Đọc kết quả ở bước sóng 405/620 nm
10	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
11	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tầm ra sau khi chạy máy xong.
12	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
13	Tắt máy tính.
14	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

Phiên giải và báo cáo kết quả:

Sử dụng phần mềm tính toán tự động tín hiệu quang học đo được theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

67. Parvo virus B19 IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định định tính kháng thể IgG kháng Parvovirus B19 trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: Parvovirus B19 IgG: Kháng thể IgG kháng Parvovirus B19.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm ELISA *classic* Parvovirus B19 IgG (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm Kg
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm ELISA *classic* Parvovirus B19 IgG (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i> Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Parvovirus B19 IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp.

Các bước	Nội dung
	Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Parvovirus B19 IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Cho 100 µl bệnh phẩm pha loãng chứng vào các giếng tương ứng Ủ ở 37°C(±1) trong 60 phút((±5) Rửa 3-4 lần bằng dung dịch rửa Cho 100 µl dung dịch cộng hợp Ủ ở 37°C(±1) trong 30 phút((±5) Rửa 3-4 lần bằng dung dịch rửa Cho vào mỗi giếng 100 µl dung dịch hiện màu Ủ ở 37°C(±1) trong 30 phút((±5) Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng Đọc kết quả ở bước sóng 405/620 nm
	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất.

Các bước	Nội dung
	Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

Phiên giải và báo cáo kết quả:

Sử dụng phần mềm tính toán tự động tín hiệu quang học đo được theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

68. Mumps virus IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgM kháng vi rút Mumps trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgM kháng vi rút Mumps.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgM kháng vi rút Mumps sẽ kết hợp với các kháng nguyên của vi rút Mumps được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgM gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgM kháng Mumps virus bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp
--	--

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

69. Mumps virus IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng vi rút Mumps trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng vi rút Mumps.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng vi rút Mumps sẽ kết hợp với các kháng nguyên của vi rút Mumps được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng Mumps virus bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- Khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride < 11.5 g/L, bilirubin < 0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoạch Âm tính
 - + Hoạch Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và /hoặc dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp
---	---

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

70. Chikungunia virus IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng Chikungunya trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KN hoặc KT hoặc KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: Chikungunia IgM: Kháng thể IgM kháng Chikungunia virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Chikungunya IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml

- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Chikungunya IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu... Pha dung dịch rửa: Pha dung dịch rửa bằng nước cất với tỷ lệ 1 dung dịch rửa + 19 nước cất Lọ kháng nguyên Chikungunya đông khô được hoàn nguyên bằng 1ml dung dịch nước rửa
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i> Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Chikungunya IgM trong Patient Editor.

Các bước	Nội dung
	Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Chikungunya IgM bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Cho 50 µl chứng thấp, chứng chuẩn, chứng cao hoặc bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng tương ứng.(Giếng A1 là giếng trống)Ủ 60 phút (± 5 phút) ở 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 60 ± 5 phút Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa 300µl/giếng. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa Cho 50µl dung dịch kháng nguyên đã hoàn nguyên vào các giếng (trừ giếng trống). Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (18 -24 độ) Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa Cho 50 µl dung dịch kháng thể vào các giếng (trừ giếng trống) Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (18 -24 độ) Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Cho 50 µl dung dịch cộng hợp Streptavidin peroxidase vào các giếng (trừ giếng trống). Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (18 -24 độ) Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa.

Các bước	Nội dung
	Cho vào mỗi giếng 100 µl TMB Đề ở nhiệt độ phòng đúng 15 phút, tránh ánh sáng Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450/620 nm trong vòng 30 sau khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tẩm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Xem xét kết quả nội kiểm (QC). Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Tính giá trị ngưỡng:

- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (CO):
 - + $OD\ CO = (OD\ CO1 + OD\ CO2)/2$
 - + CO1: Giá trị chứng chuẩn 1
 - + CO2: Giá trị chứng chuẩn 2
- Tính tỉ số mẫu: Tỉ số mẫu = giá trị OD của mẫu x 10 / giá trị ngưỡng

Diễn giải kết quả

- Nếu tỉ số < 9: Âm tính.
- Nếu $9 \leq \text{tỉ số} \leq 11$: Nghi ngờ → mẫu thử cần phải xét nghiệm lại. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định. Nên thử lại sau 2-4 tuần. Nếu kết quả vẫn là $9 \leq \text{tỉ số} \leq 11$ thì kết luận mẫu thử Âm tính
- Nếu tỉ số > 11: Dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

71. Chikungunia virus IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng Chikungunya trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KN hoặc KT hoặc KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: Chikungunia IgG: Kháng thể IgG kháng Chikungunia virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Chikungunya IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dầu côn dẫn điện 1000 μ L tiệt trùng
- Dầu côn dẫn điện 300 μ L tiệt trùng
- Dầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Dầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml

- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh Cái
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA Cái
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Chikungunya IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu... Pha dung dịch rửa: Pha dung dịch rửa bằng nước cất với tỷ lệ 1 dung dịch rửa + 19 nước cất Lọ kháng nguyên Chikungunya đông khô được hoàn nguyên bằng 1ml dung dịch nước rửa
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i>

Các bước	Nội dung
	Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Chikungunya IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Chikungunya IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Cho 50 µl chứng thấp, chứng chuẩn, chứng cao hoặc bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng tương ứng.(Giếng A1 là giếng trống) Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 60 ± 5 phút Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa 300µl/giếng. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa Cho 50µl dung dịch kháng nguyên đã hoàn nguyên vào các giếng (trừ giếng trống). Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (18 -24 độ) Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa Cho 50 µl dung dịch kháng thể vào các giếng (trừ giếng trống) Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (18 -24 độ) Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa.

Các bước	Nội dung
	Cho 50 µl dung dịch cộng hợp Streptavidin peroxidase vào các giếng (trừ giếng trống). Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (18 -24 độ) Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Cho vào mỗi giếng 100 µl TMB Để ở nhiệt độ phòng đúng 15 phút, tránh ánh sáng Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450/620 nm trong vòng 30 sau khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tẩm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Tính giá trị ngưỡng:

- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (CO):

$$OD\ CO = (OD\ CO1 + OD\ CO2)/2$$

CO1: Giá trị chứng chuẩn 1

CO2: Giá trị chứng chuẩn 2

- Tính tỉ số mẫu: Tỉ số mẫu = giá trị OD của mẫu x 10 / giá trị ngưỡng

Diễn giải kết quả

- Nếu tỉ số < 9: Âm tính.

- Nếu $9 \leq \text{tỉ số} \leq 11$: Nghi ngờ $\rightarrow$ mẫu thử cần phải xét nghiệm lại. Nếu vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định. Nên thử lại sau 2-4 tuần. Nếu kết quả vẫn là $9 \leq \text{tỉ số} \leq 11$ thì kết luận mẫu thử Âm tính.
- Nếu tỉ số > 11 : Dương tính.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

72. SARS-CoV-2 IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgG người có trong huyết thanh hoặc huyết tương hướng vào vùng S1 của spike protein của SARS-CoV-2. Xét nghiệm SARS-CoV-2 S1 IgG hỗ trợ phát hiện IgG giúp cho việc xác nhận có tiếp xúc với mầm bệnh và hỗ trợ xác định tình trạng miễn dịch bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- CAL A (Calibrator A) : Chất hiệu chuẩn A
- CAL B (Calibrator B) : Chất hiệu chuẩn B
- CAL C (Calibrator C) : Chất hiệu chuẩn C
- CAL D (Calibrator D) : Chất hiệu chuẩn D

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm SARS-CoV-2 S1 IgG (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng

- khay vi giếng Microplate
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml, 1000 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm SARS-CoV-2 S1 IgG (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng 1:50 với nước cất trước khi sử dụng.
4	Chuẩn bị dung dịch đệm mẫu: Pha loãng 1:5 với nước cất trước khi sử dụng, chuẩn bị cộng hợp, dung dịch hiện màu...
5	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
6	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
7	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
8	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm SARS-CoV-2 S1 IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm SARS-CoV-2 S1 IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn

Các bước	Nội dung
	loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
9	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1:101 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ. - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất hiệu chuẩn, chất chứng và mẫu. - Để giếng A1 đến D1 là giếng cho chất chuẩn từ A đến D, giếng E1 là chứng âm, giếng F1 là chứng dương. - Cho 100 µl chất hiệu chuẩn A đến D (4 giếng), 100 µl chất chứng (2 giếng) và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định. Ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C, tránh tiếp xúc với ánh sáng mạnh. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, ủ trong 5 phút sau đó lắc kỹ tám trong 5 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.
10	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
11	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
12	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
13	Tắt máy tính.
14	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Đánh giá định lượng

- Kết quả định lượng được xác định dựa trên đường chuẩn. Các tín hiệu đo quang học (OD) của các chất chuẩn được vẽ đồ thị dựa trên hoạt tính kháng thể của chúng (tính bằng IU/ml hoặc U/ml). Hoạt tính kháng thể của chuẩn được cung cấp trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng cụ thể theo lô được cung cấp cùng với bộ xét nghiệm.
- Phạm vi nghi ngờ:
 - Phạm vi nghi ngờ được chỉ định trên các chứng chỉ kiểm tra chất lượng được cung cấp cùng với bộ xét nghiệm và cho biết phạm vi kết quả xét nghiệm ở khoảng nghi ngờ.
 - Các giá trị dưới phạm vi nghi ngờ → kết quả xét nghiệm âm tính;
 - Các giá trị trên phạm vi nghi ngờ → kết quả xét nghiệm dương tính.
- Phạm vi đo: Phạm vi đo được ghi rõ trên chứng chỉ kiểm tra chất lượng được cung cấp cùng với bộ xét nghiệm.
 - Các mẫu có kết quả thử nghiệm cao hơn giới hạn định lượng trên phải được báo cáo là > giá trị tối đa. Trong trường hợp mẫu bệnh phẩm cho kết quả xét nghiệm cao hơn giới hạn định lượng trên, mẫu đó có thể được thử nghiệm ở độ pha loãng cao hơn. Hoạt tính kháng thể thu được sau đó phải được nhân với hệ số pha loãng bổ sung.
 - Các mẫu có kết quả xét nghiệm thấp hơn giới hạn định lượng dưới phải được báo cáo là < giá trị tối thiểu.

Đánh giá định tính

Kết quả được tính toán bằng cách so sánh tín hiệu đo quang học (OD) của mẫu bệnh nhân với tín hiệu đo quang trung bình của mẫu hiệu chuẩn B (mẫu chuẩn ngưỡng CAL B) được thử nghiệm hai lần. (OD TB CAL B).

Nếu mẫu của bệnh nhân có giá trị OD = OD trung bình CAL B +/- 20% → mẫu được coi là nghi ngờ → cần thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ → đánh giá là: Không xác định.

- Các mẫu có giá trị OD cao hơn OD trung bình CAL B trên 20% → được đánh giá là: Dương tính.
- Các mẫu có giá trị OD thấp hơn OD trung bình CAL B dưới 20% → được đánh giá là: Âm tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

73. SARS-CoV-2 IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgM người có trong huyết thanh hoặc huyết tương hướng vào vùng S1 của spike protein của SARS-CoV-2. nghiệm SARS-CoV-2 S1 IgM hỗ trợ phát hiện các bệnh nhiễm trùng cấp tính bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- CAL A (Calibrator A) : Chất hiệu chuẩn A
- CAL B (Calibrator B) : Chất hiệu chuẩn B
- CAL C (Calibrator C) : Chất hiệu chuẩn C
- CAL D (Calibrator D) : Chất hiệu chuẩn D

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm SARS-CoV-2 S1 IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate

- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm SARS-CoV-2 S1 IgM (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng 1:50 với nước cất trước khi sử dụng.
4	Chuẩn bị dung dịch đệm mẫu: Pha loãng 1:5 với nước cất trước khi sử dụng, chuẩn bị cộng hợp, dung dịch hiện màu...
5	Chuẩn bị mẫu: Hấp thu trước các yếu tố dạng thấp (Rf) bằng cách pha loãng mẫu của bệnh nhân trong dung dịch đệm pha loãng 1x của xét nghiệm miễn dịch IgM và ủ sau đó trong tối thiểu 15 phút ở nhiệt độ phòng.
6	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
7	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
8	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
9	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm SARS-CoV-2 S1 IgM trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of

Các bước	Nội dung
	Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm SARS-CoV-2 S1 IgM bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
10	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất hiệu chuẩn, chất chứng và mẫu. - Để giếng A1 đến D1 là giếng cho chất chuẩn từ A đến D, giếng E1 là chứng âm, giếng F1 là chứng dương. - Cho 100 µl chất hiệu chuẩn A đến D (4 giếng), 100 µl chất chứng (2 giếng) và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định. Ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 30 +/- 3 phút ở nhiệt độ 20 °C – 32°C, tránh tiếp xúc với ánh sáng mạnh. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, ủ trong 5 phút sau đó lắc kỹ tám trong 5 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.
14	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
15	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
16	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
17	Tắt máy tính.

Các bước	Nội dung
18	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Máy xét nghiệm tự động tính toán kết quả dựa trên các đường chuẩn. Kết quả được hiển thị dưới dạng chỉ số ngưỡng (COI)-tín hiệu mẫu/ ngưỡng phản ứng. Tham khảo hướng dẫn sử dụng thiết bị để biết thông tin chi tiết.

Kết quả nên được diễn giải như sau:

- $COI < 1.0$: Âm tính - không có kháng thể kháng virus SARS-CoV-2 trong huyết thanh và huyết tương người
- $COI \geq 1.0$: Dương tính - có kháng thể kháng virus SARS-CoV-2 trong huyết thanh và huyết tương người.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

74. SARS-CoV-2 Ab total miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện các kháng thể (bao gồm cả IgG) đối với virus SARS-CoV-2 trong huyết thanh và huyết tương người. Xét nghiệm này nhằm mục đích hỗ trợ xác định phản ứng miễn dịch đối với SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- SARS CoV2: Severe acute respiratory syndrome corona virus 2-virus corona gây hội chứng hô hấp cấp tính nặng 2
- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Anti-SARS-CoV-2 (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Controls
- Calibrators
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) 20 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiết trùng

- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Hệ thống lọc nước khử ion
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C (nếu có)
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm Anti-SARS-CoV-2 (VD hoặc tương đương)

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-SARS-CoV-2
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Kiểm tra tình trạng hiệu chuẩn của máy. Hiệu chuẩn máy khi có yêu cầu.
3	Chạy chứng Precicontrol Anti-SARS-CoV-2 bao gồm 2 mức: PC ACoV-2 1 và PC ACoV-2 2. Đánh giá kết quả QC đạt, tiến hành chạy mẫu bệnh phẩm
4	Chạy mẫu theo các bước sau:
5	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước sau	
6	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
7	Vào màn hình Workplace → Test Selection
8	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
9	Chọn tên test là Anti-SARS-CoV-2
10	Vào Barcode Read Error
11	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
12	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
13	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Nếu chạy mẫu có barcode thì bỏ các bước từ 6-13 và tiến hành như sau:	
14	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm của PXN

15	Tiếp tục quay lại bước 12 và 13
----	---------------------------------

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Máy xét nghiệm tự động tính toán kết quả dựa trên các đường chuẩn. Kết quả được hiển thị dưới dạng chỉ số ngưỡng (COI)-tín hiệu mẫu/ ngưỡng phản ứng. Tham khảo hướng dẫn sử dụng thiết bị để biết thông tin chi tiết.

Kết quả nên được diễn giải như sau:

- $COI < 1.0$: Âm tính - không có kháng thể kháng virus SARS-CoV-2 trong huyết thanh và huyết tương người
- $COI \geq 1.0$: Dương tính - có kháng thể kháng virus SARS-CoV-2 trong huyết thanh và huyết tương người.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Mẫu bệnh phẩm có chứa các chất gây nhiễu vượt quá nồng độ theo khuyến cáo của nhà sản xuất như: mẫu có nồng độ bilirubin, biotin, các dược phẩm.
- Sử dụng hóa chất quá hạn sử dụng.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng...

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

75. Dengue virus IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện xác định định tính kháng thể IgM của virus Dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay): Thử nghiệm miễn dịch hấp phụ gắn enzym.
- OD (Optical density): Mật độ quang

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm ELISA Dengue Virus IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1 μ l đến 200 μ l
- Đầu côn 100 μ l đến 1000 μ l
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Dengue Virus IgM (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: nhập thủ công hoặc nhập bệnh nhân có mã vạch - Thực hiện thao tác nhập xác định bệnh nhân với thử nghiệm Dengue virus IgM theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: theo hướng dẫn nhà sản xuất. Ví dụ tương đương Hấp thụ Rf được thực hiện bằng cách ủ mẫu của bệnh nhân trong dung dịch đệm pha loãng Rf trong 15 phút ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở

Các bước	Nội dung
	4 ° C Thêm 100 µl mẫu đã pha loãng hoặc huyết thanh chứng âm/ chuẩn sẵn sàng sử dụng vào các giếng thích hợp của thanh vi giếng. Để trống 1 giếng trống. Ủ mẫu trong 60 phút (+/- 5 phút) tại 37 độ C (+/-1 độ C) trong máy ủ ấm. Rửa toàn bộ các giếng với dung dịch rửa Thêm 100µl chất cộng hợp sẵn sàng sử dụng vào các giếng thích hợp (trừ giếng trống). Ủ chất cộng hợp trong 30 phút (+/- 1 phút)* ở 37 ° C (+/-1 °C) Rửa toàn bộ các giếng với dung dịch rửa Thêm 100µl dung dịch cơ chất sẵn sàng sử dụng cho mỗi giếng (bao gồm giếng trống). Ủ cơ chất trong 30 phút (+/- 1 phút) tại 37 °C (+/- 1 °C) . Đảm bảo ủ trong tối. Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, lắc các giếng Đọc kết quả OD trong 60 phút ở bước sóng 405 nm dựa vào giếng trống, tham khảo bước sóng từ 620 nm đến 690 nm
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy ELISA tự động

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

- Các kết quả xét nghiệm được tính được cài đặt trên máy tự động bằng cách: Sử dụng phần mềm tính toán tự động tín hiệu quang học đo được.
- Đánh giá xét nghiệm dựa trên giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng đặc hiệu số lô với đường chuẩn có trong các bộ thuốc thử để các giá trị OD thu được có thể phản ánh sự hoạt động của kháng thể tương ứng. Giá trị OD của giếng trống phải được trừ ra trước khi tính toán.
- Trong dòng đầu tiên của bảng, khoảng giá trị OD cho huyết thanh chuẩn được mô tả bao gồm toàn bộ khoảng hiệu lực cho chất chuẩn. Theo giá trị OD trung bình đo được của huyết thanh chuẩn, có thể chọn cột tương ứng. Cột này chứa thông tin về các giá trị OD ngưỡng trên và dưới để cho phép đánh giá mẫu bệnh nhân. Các giá trị OD dưới ngưỡng giới hạn dưới được đánh giá là âm tính và các giá trị trên ngưỡng giới hạn trên được đánh giá là dương tính.
- Khoảng nghi ngờ được quy định trên Giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng và cho biết kết quả khoảng nghi ngờ. Kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

76. Dengue virus IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện xác định định tính kháng thể IgG của virus Dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay): Thử nghiệm miễn dịch hấp phụ gắn enzym.
- OD (Optical density): Mật độ quang

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm ELISA Dengue Virus IgG (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 4 người)
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1 μ l đến 200 μ l
- Đầu côn 100 μ l đến 1000 μ l
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Dengue Virus IgG (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: nhập thủ công hoặc nhập bệnh nhân có mã vạch - Thực hiện thao tác nhập xác định bệnh nhân với thử nghiệm Dengue virus IgG theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: theo hướng dẫn nhà sản xuất. Ví dụ tương đương Thêm 100 µl mẫu đã pha loãng hoặc huyết thanh chứng âm/ chuẩn

Các bước	Nội dung
	sẵn sàng sử dụng vào các giếng thích hợp của thanh vi giếng. Để trống 1 giếng trắng. Ủ mẫu trong 60 phút (+/- 5 phút) tại 37⁰ C (+/-1⁰ C) trong máy ủ ấm. Rửa toàn bộ các giếng với dung dịch rửa Thêm 100µl chất cộng hợp sẵn sàng sử dụng vào các giếng thích hợp (trừ giếng trống). Ủ chất cộng hợp trong 30 phút (+/- 1 phút)* ở 37⁰ C (+/- 1⁰C) Rửa toàn bộ các giếng với dung dịch rửa Thêm 100µl dung dịch cơ chất sẵn sàng sử dụng cho mỗi giếng (bao gồm giếng trống). Ủ cơ chất trong 30 phút (+/- 1 phút) tại 37 °C (+/- 1 °C) . Đảm bảo ủ trong tối. Thêm 100µl dung dịch dùng phản ứng vào mỗi giếng, lắc các giếng Đọc kết quả OD trong 60 phút ở bước sóng 405 nm dựa vào giếng trống, tham khảo bước sóng từ 620 nm đến 690 nm
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

Các kết quả xét nghiệm được tính được cài đặt trên máy tự động bằng cách: Sử dụng phần mềm tính toán tự động tín hiệu quang học đo được.

Đánh giá xét nghiệm dựa trên giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng đặc hiệu số lô với đường chuẩn có trong các bộ thuốc thử để các giá trị OD thu được có thể phản ánh sự hoạt động của kháng thể tương ứng. Giá trị OD của giếng trống phải được trừ ra trước khi tính toán.

Trong dòng đầu tiên của bảng, khoảng giá trị OD cho huyết thanh chuẩn được mô tả bao gồm toàn bộ khoảng hiệu lực cho chất chuẩn. Theo giá trị OD trung bình đo được của huyết thanh chuẩn, có thể chọn cột tương ứng. Cột này chứa thông tin về các giá trị OD ngưỡng trên và dưới để cho phép đánh giá mẫu bệnh nhân. Các giá trị OD dưới ngưỡng giới hạn dưới được đánh giá là âm tính và các giá trị trên ngưỡng giới hạn trên được đánh giá là dương tính.

Khoảng nghi ngờ được quy định trên Giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng và cho biết kết quả khoảng nghi ngờ. Kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

77. EBV EA-D IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên sớm của Epstein - Barr virus (Epstein Barr Virus Early Antigen Diffuse-EBV EA-D) trong huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- EBV: Epstein-Barr Virus
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (xét nghiệm miễn dịch gắn enzyme)
- EBV EA-D: Epstein Barr Virus Early Antigen Diffuse-kháng nguyên sớm của Epstein - Barr virus

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ EBV-EA-D IgG kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Đầu côn 1 μ l đến 200 μ l
- Đầu côn 100 μ l đến 1000 μ l
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Bông tiêm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml, 1000 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dụng cụ lấy mẫu theo hướng dẫn ở sổ tay lấy mẫu
- Tủ lạnh 2-8°C
- Dàn máy ELISA tự động.
- Máy ly tâm thường
- Pipet 1000µl
- Pipet 200 µl
- Pipet 10µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bước 1. Khởi động hệ thống:

Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.

Bước 2. Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...

Bước 3. Kiểm tra hệ thống:

Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy.

Bước 4. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy

Đề bộ sinh phẩm EBV-EA-D IgG ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi thực hiện xét nghiệm

Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy.

Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước

Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng là EBV-EA-D.

Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.

Bước 5. Nhập thông tin bệnh nhân:

a. Nhập thủ công:

Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và các thử nghiệm liên quan trong Patient Editor.

Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp.

Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients.

Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với loại thử nghiệm bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm là EBV-EA-D. Lựa chọn giếng blank (B1), chứng (R3, R4a, R4B) và calibrator (R5) theo hình dưới đây:

A	B1	S2											
B	R3	S3											
C	R4a	S4											
D	R4b	S5											
E	R5	S6											
F	R5	S7											
G	R5	S8											
H	S1	S9											

Bệnh nhân sẽ được chọn từ giếng H1.

b. Nhập bệnh nhân có mã vạch:

Nhấn File -> New -> Worklist

Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK

Nhấn Start

Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí.

Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip.

Nhấn OK

Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, PC, calibrator và nhập OK

Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó. Chương trình bắt đầu chạy test.

Bước 6. Thêm plate vào các thời điểm nhất định:

Edit -> Panel Definition -> Patient Details để thêm bệnh nhân và tests EBV-EA-D -> OK

Add Plate -> Add Assay -> Add Patient

Thêm vào đầu tip, sinh phẩm, nước rửa và mẫu bệnh nhân-> OK

Máy sẽ chạy theo một worklist mới thiết lập

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

- Xem xét kết quả QC:

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*

Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*

NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC

Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

✓ Kết quả được diễn giải như sau:

Giá trị ISR	Kết quả	Giải thích
≤ 0.90	Âm tính	Không phát hiện thấy kháng thể EBV-EA-D IgG
0.91-1.09	Vùng nghi ngờ	Mẫu nên được làm lại lần hai
≥ 1.10	Dương tính	Phát hiện được kháng thể EBV-EA-D IgG, gợi ý tình trạng đang nhiễm hoặc đã nhiễm EBV virus.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

78. EBV EB-NA IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính các kháng thể IgG kháng kháng nguyên nhân của virus Epstein-Barr (EBNA) trong huyết thanh và huyết tương người trên hệ thống máy tự động. Xét nghiệm EBV EB-NA-IgG được sử dụng để hỗ trợ chẩn đoán chứng tăng bạch cầu đơn nhân nhiễm trùng (infectious mononucleosis - IM) và hỗ trợ xác định giai đoạn nhiễm virus Epstein-Barr (EBV) bằng kỹ thuật CMIA (miễn dịch hóa phát quang).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật CMIA (miễn dịch hóa phát quang). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ hoạt chất phát quang gắn với KN hoặc KT hoặc KKT. Khi kết hợp với một thuốc thử kích hoạt, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ tạo ra ánh sáng. Kết quả của phản ứng hóa phát quang được tính bằng đơn vị ánh sáng tương đối (RLU).

Định nghĩa:

- EBV: Epstein-Barr Virus
- EBNA-1 IgG: kháng thể IgG kháng Epstein-Barr Nuclear Antigen-1
- CMIA: Chemiluminescent **M**icroparticle **I**mmuno**A**ssay): thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang.
- Reaction Vessels (RV): Cồng phản ứng.
- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng.
- Sample Cups: Cốc đựng mẫu
- Septum: Màng ngăn
- Replacement Caps: Nắp thay thế

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm EBV EBNA-1 IgG (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls

- Calibrators
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 10 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Dụng cụ lấy mẫu theo hướng dẫn ở sổ tay lấy mẫu
- Tủ lạnh 2-8°C
- Tủ âm sâu (-70°C)
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy miễn dịch tự động (VD hoặc tương đương)
- Máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Máy ly tâm thường
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 µl, 200 µl và 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm EBV EBNA-1 IgG (VD hoặc tương đương)

Các bước	Xét nghiệm định tính EBV EBNA-1 IgG
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests và nạp thêm thuốc thử nếu cần
2	Kiểm tra tình trạng hiệu chuẩn của máy
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên thì tiến hành chạy chứng EBV EBNA control bao gồm 2 mức: EBV EBNA NEG và EBV EBNA POS. Kết quả QC đạt, tiến hành chạy mẫu bệnh phẩm
4	Chạy mẫu theo các bước sau:
5	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 6-10:	
6	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng.
7	Vào màn hình ORDERS → CREATE ORDERS → SINGLE SPECIMEN.
8	Nhập + R/P: vị trí mẫu trên khay + SID: mã số bệnh nhân - Chọn xét nghiệm / panel là EBV EBNA-1 IgG - Nhấn ADD ORDER.
9	Đưa khay mẫu vào khu nạp giá mẫu ở vị trí chạy mẫu bệnh nhân thường quy.
10	- Chuyển máy sang chế độ RUNNING nếu máy đang ở IDLE.
Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 11-13	
11	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Quản lý thông tin xét nghiệm

12	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu trắng, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
13	Nhấn RUN (F8)

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

- Xem xét kết quả QC:

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*

Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*

NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC

Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Ngưỡng phát hiện là 1.00

Kết quả được biện luận như sau:

- $S/CO < 0.50$: Không phản ứng.
- $S/CO: 0.50 \text{ đến } < 1.00$ Grayzone (Vùng nghi ngờ).
- $S/CO \geq 1.00$: Có phản ứng.

Mẫu có kết quả EBV EBNA-1 IgG trong vùng nghi ngờ có thể chứa nồng độ kháng thể EBNA-1 IgG ở mức thấp. Khuyến cáo kiểm tra những mẫu này với xét nghiệm EBV VCA IgM và EBV VCA IgG và/hoặc lấy mẫu mới để xét nghiệm lại sau từ 1 đến 2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

79. Influenza virus IgA miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgA kháng Influenza vi rút trong huyết thanh/huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgA kháng vi rút Influenza.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgA kháng vi rút Influenza sẽ kết hợp với các kháng nguyên của vi rút Influenza được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgA gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgA kháng vi rút Influenza bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tuyền thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoạch Âm tính
 - + Hoạch Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

80. Influenza virus IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng Influenza vi rút trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng vi rút Influenza.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng vi rút Influenza sẽ kết hợp với các kháng nguyên vi rút Influenza được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng vi rút Influenza bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Vật tư tiêu hao, vật tư thay thế
- Vật tư tiêu hao
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng

- Vật tư thay thế
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang
- Vật tư thay thế khác
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Khoa xét nghiệm vi sinh/Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng

7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phân giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoạch Âm tính
 - + Hoạch Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/ hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

81. SARS-CoV-2 S Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mục đích hỗ trợ để đánh giá phản ứng miễn dịch thích ứng ở người, gồm cả các kháng thể trung hòa, đối với protein SARS-CoV-2 S sau khi nhiễm SARS-CoV-2 tự nhiên hoặc ở những người được tiêm vắc-xin bằng kỹ thuật ECLIA (miễn dịch điện hóa phát quang).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ECLIA (miễn dịch điện hóa phát quang). Dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KKT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hòa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

Định nghĩa:

- + SARS - CoV - 2: Severe acute respiratory syndrome corona virus 2.
- + Cal (calibration): chất hiệu chuẩn. Bộ bao gồm Cal1 và Cal2.
- + Sample cup: Cốc chứa mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn 1000 μ L - tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 10 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy phân tích tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Anti-SARS-CoV-2 S (VD hoặc tương đương)

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-SARS-CoV-2
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Kiểm tra tình trạng hiệu chuẩn của máy. Hiệu chuẩn máy khi có yêu cầu.
3	Chạy chứng Precicontrol Anti-SARS-CoV-2 S. Đánh giá kết quả QC đạt, tiến hành chạy mẫu bệnh phẩm
4	Chạy mẫu theo các bước sau:
5	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước sau	
6	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
7	Vào màn hình Workplace → Test Selection
8	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
9	Chọn tên test là Anti-SARS-CoV-2
10	Vào Barcode Read Error
11	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
12	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.

13	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Nếu chạy mẫu có barcode thì bỏ các bước từ 6-13 và tiến hành như sau:	
14	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm của PXN
15	Tiếp tục quay lại bước 12 và 13

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

Phiên giải và báo cáo kết quả:

Máy phân tích tự động tính toán nồng độ chất phân tích trong mỗi mẫu đo dưới dạng U/mL

Kết quả	Diễn giải
< 0.80 U/mL	Âm tính với anti-SARS-CoV-2-S
≥ 0.80 U/mL	Dương tính với anti-SARS-CoV-2-S

Các kết quả lặp lại trùng lặp ở flow ACOV2S DR	Diễn giải
Cả hai xét nghiệm lặp lại trùng lặp < 0.80 U/mL	Âm tính với anti-SARS-CoV-2-S
Một hoặc cả hai xét nghiệm lặp lại trùng lặp ≥ 0.80 U/mL	Phản ứng lặp lại, dương tính với anti-SARS-CoV-2-S

Lưu ý:

Một kết quả xét nghiệm âm tính không loại trừ hoàn toàn khả năng nhiễm SARS-CoV-2. Các mẫu huyết thanh hoặc huyết tương từ giai đoạn nhiễm rất sớm (tiền chuyển đổi huyết thanh) có thể cho kết quả âm tính. Do đó, xét nghiệm này không thể được sử dụng để chẩn đoán một nhiễm cấp. Đã có ghi nhận một số bệnh nhân đã khẳng định nhiễm không phát triển kháng thể SARS-CoV-2.

Hơn nữa, chuẩn độ kháng thể suy giảm đã được ghi nhận ở một số cá thể trong vòng vài tháng sau khi nhiễm, một điểm đặc trưng cũng được ghi nhận với các loại vi-rút corona khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Để kiểm tra chất lượng, sử dụng PreciControl Anti-SARS-CoV-2 S.
- Các loại mẫu chứng thích hợp khác cũng có thể được sử dụng.
- Chạy các mẫu chứng với nồng độ khác nhau tối thiểu là một lần cho mỗi 24 giờ khi xét nghiệm vẫn đang sử dụng, một lần với mỗi hộp cobas e pack và sau mỗi lần chuẩn.
- Khoảng cách giữa các lần chạy mẫu chứng và giá trị giới hạn nên tùy thuộc vào yêu cầu riêng của từng phòng thí nghiệm. Kết quả mẫu chứng phải nằm trong thang. Mỗi phòng xét nghiệm nên thiết lập các biện pháp hiệu chỉnh nếu các giá trị mẫu chứng nằm ngoài thang đo.
- Nếu cần, tiến hành đo lại các mẫu có liên quan.
- Tuân thủ các quy định chính phủ và hướng dẫn của địa phương về kiểm tra chất lượng.

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

82. *Streptococcus pyogenes* ASO miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định lượng kháng thể Antistreptolysin O trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ngưng kết hạt Latex trên máy miễn dịch tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý:

Kháng thể antistreptolysin O ngưng kết với hạt Latex phủ bởi kháng nguyên streptolysin O. Sự kết hợp này xác định bằng cách đo độ đục trên máy miễn dịch tự động.

Định nghĩa:

- ASLO/ASO (Anti Streptolysin O): Kháng thể người kháng lại Streptolysin O của *Streptococcus pyogenes*.
- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Còn 70%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml

- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định. (tham khảo phụ lục 1, phụ lục 2).

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy. Chuẩn bị các hóa chất kèm theo.
2	Kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không.
3	Chạy chứng (Tham khảo qui trình chạy chứng...)
4	Chạy mẫu theo các bước sau
4.1	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 4.2 – 4.9:	
4.2	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm.
4.3	Hút huyết thanh/huyết tương vào cốc đựng mẫu tương ứng.
4.4	Vào màn hình thao tác theo hướng dẫn của nhà sản xuất
4.5	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
4.6	Chọn test ASO
4.7	Nhập số rack và vị trí mẫu
4.8	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần xét nghiệm (hoặc cốc chứa mẫu bệnh phẩm) lên Rack đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
4.9	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 4.10 – 4.12:	
4.10	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm quản lý thông tin xét nghiệm
4.11	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack quy định, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
4.12	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất

4.2. Nhận định kết quả

- Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Đọc kết quả và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường:
 - + Có thể đánh giá nhiễm trùng liên cầu bằng cách làm lại test sau 1 hoặc 2 tuần. Chẩn đoán dựa trên việc phối hợp các bằng chứng lâm sàng và xét nghiệm.
 - + Tuy nhiên giá trị theo lứa tuổi này tùy thuộc vào vị trí địa lý, tỷ lệ nhiễm trùng liên cầu lưu hành theo địa phương từng nhóm cộng đồng người bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.
- Trong một số rất ít trường hợp bệnh lý miễn dịch kháng thể gammopathy đặc biệt typ IgM (Waldenstroms macroglobulinemia) có thể gây nên kết quả không xác thực.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

83. *Bordetella pertussis* IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng *Bordetella pertussis* trong huyết thanh/ huyết tương của người để chẩn đoán bệnh ho gà hoặc kiểm tra đáp ứng miễn dịch sau tiêm phòng vacxin ho gà.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng *Bordetella pertussis*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng *Bordetella pertussis* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Bordetella pertussis* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được định lượng bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng *Bordetella pertussis* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm

- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride < 11.5 g/L, bilirubin < 0.201 g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn.

- Kết quả dương tính không phân biệt được do đáp ứng miễn dịch sau tiêm chủng hay nhiễm tự nhiên.	- Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp - Cần phân tích kết quả kết hợp triệu chứng lâm sàng và các xét nghiệm khác.
--	---

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

84. *Bordetella pertussis* IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgM kháng *Bordetella pertussis* trong huyết thanh/ huyết tương của người để chẩn đoán nhiễm vi khuẩn ho gà.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgM kháng *Bordetella pertussis*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgM kháng *Bordetella pertussis* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Bordetella pertussis* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgM kháng *Bordetella pertussis* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C - 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tuyền thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn.

- Kết quả dương tính không phân biệt được do đáp ứng miễn dịch sau tiêm chủng hay nhiễm tự nhiên.	- Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp - Cần phân tích kết quả kết hợp triệu chứng lâm sàng và các xét nghiệm khác.
---	--

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

85. *Chlamydia trachomatis* IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng *Chlamydia trachomatis* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng *Chlamydia trachomatis*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng *Chlamydia trachomatis* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Chlamydia trachomatis* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng *Chlamydia trachomatis* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phân giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

86. *Chlamydia trachomatis* IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgM kháng *Chlamydia trachomatis* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgM kháng *Chlamydia trachomatis*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgM kháng *Chlamydia trachomatis* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Chlamydia trachomatis* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgM gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgM kháng *Chlamydia trachomatis* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tuyền thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phân giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Đề kháng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

87. *Chlamydia pneumoniae* IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng *Chlamydia pneumoniae* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng *Chlamydia pneumoniae*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng *Chlamydia pneumoniae* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Chlamydia pneumoniae* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng *Chlamydia pneumoniae* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Đề khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

88. *Chlamydia pneumoniae* IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgM kháng *Chlamydia pneumoniae* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgM kháng *Chlamydia pneumoniae*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgM kháng *Chlamydia pneumoniae* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Chlamydia pneumoniae* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgM gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgM kháng *Chlamydia pneumoniae* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoạch Âm tính
 - + Hoạch Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

89. *Chlamydia trachomatis* IgA miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgA kháng *Chlamydia trachomatis* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgA kháng *Chlamydia trachomatis*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgA kháng *Chlamydia trachomatis* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Chlamydia trachomatis* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgA gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgA kháng *Chlamydia trachomatis* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phân giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

90. *Leptospira* IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgG đối với *Leptospira spp.* trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Nguyên lý:** Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

- Định nghĩa:

- + *Leptospira* IgG: Kháng thể IgG kháng *Leptospira*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Leptospira* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1100 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L- tiệt trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Tuýp 5-15 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất..

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Leptospira* IgG/IgM (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i>

Các bước	Nội dung
	Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Leptospira IgG/IgM trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Leptospira IgG/IgM bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng (đối với IgG: 1 bệnh phẩm +100 dilution buffer DILB) vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2 Ủ 60 phút (± 5 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) Rửa tám 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank. Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) Rửa tám 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank

Các bước	Nội dung
	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) Nhỏ 100 μl dung dịch dừng phản ứng STOP Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt yêu cầu:
 - Giá trị các chứng và chuẩn nằm trong giới hạn cho phép đã được chứng nhận kèm theo lô sản phẩm. Nếu giá trị này nằm ngoài khoảng thì cần tiến hành xét nghiệm lại.
 - Mẫu trắng blank < 0.25 OD
 - Chứng âm phải âm tính.
 - Sử dụng bảng để tính giá trị dao động trong khoảng cho phép của mẫu chuẩn SD standard serum đối với từng lô.
 - OD của standard serum và cut off serum không được chênh quá 20%.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

Kết quả

- + Âm tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm $<$ Khoảng giá trị ngưỡng.
- + Dương tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm $>$ Khoảng giá trị ngưỡng.

+ Không xác định: Khi giá trị mẫu bệnh phẩm nằm trong khoảng ranh giới.

IgG: chỉ điểm đã từng có nhiễm virus hoặc sau tiêm chủng thành công.

- Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.
- Hạn chế của kỹ thuật: Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ số tỷ lệ pha loãng.
- Các trường hợp cần kiểm tra lại:
 - Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần. 87,5% có sự tăng hàm lượng kháng thể IgG sau 2 hoặc 3 tháng. Một số không có đáp ứng IgG. Độ hoạt tính của IgG biểu thị sự nhiễm trùng với *Leptospira*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Các mẫu nhiễm khuẩn hoặc đã bất hoạt bởi nhiệt có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.
- Không sử dụng hoán đổi khay thuốc thử tích hợp giữa các loại máy xét nghiệm khác nhau. Sau khi mở, một bộ thuốc thử tích hợp chỉ được sử dụng trên một loại máy nhất định cho đến hết.
- Chất gây nhiễu: Các nghiên cứu có đối chứng về các chất/ tình trạng có nguy cơ gây nhiễu cho thấy đặc tính hiệu năng của xét nghiệm không bị ảnh hưởng bởi các chất chống đông (kali EDTA, natri heparin); tán huyết (nồng độ hemoglobin lên đến 1000 mg/dL); mỡ máu (nồng độ triglycerid lên đến 3000 mg/dL); tăng bilirubin máu (nồng độ bilirubin lên đến 20 mg/dL), tăng albumin máu (nồng độ albumin lên đến 5,0 g/dL); hoặc tối đa 6 chu trình làm đông – rã đông mẫu. Việc sử dụng các mẫu huyết tương được chống đông bằng citrat làm giảm tín hiệu đo được, dẫn tới các kết quả bị đánh giá thấp hơn thực tế (khoảng 20%).

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

91. *Leptospira* IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgM đối với *Leptospira spp.* trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Nguyên lý:** Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

- Định nghĩa:

+ *Leptospira* IgM: Kháng thể IgM kháng *Leptospira*

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Leptospira* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1100 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L- tiệt trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Tuýp 5-15 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Leptospira* IgG/IgM (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu... Hấp phụ yếu tố thấp: (pha Rf-absorbent RF (V1) + dilution buffer DILB (V2) = 1 + 4 = Rf-dilution bufer (V3) (200 µl Rf-absorbent RF + 800 µl dilution buffer DILB); pha loãng bệnh phẩm V4+V3 = 1+100 (10 µl bệnh phẩm + 1000 µl Rf-dilution bufer yếu tố thấp đã pha). Ủ bệnh phẩm đã xử lý trên 15 phút ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4°C.
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.

Các bước	Nội dung
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i> Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Leptospira IgG/IgM trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Leptospira IgG/IgM bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1 - Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2 Ủ 60 phút (± 5 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) Rửa tám 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank. Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) Rửa tám 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng

Các bước	Nội dung
	Nhỏ 100 μl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ$C) Nhỏ 100 μl dung dịch dừng phản ứng STOP Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tẩm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt yêu cầu
- Giá trị các chứng và chuẩn nằm trong giới hạn cho phép đã được chứng nhận kèm theo lô sản phẩm. Nếu giá trị này nằm ngoài khoảng thì cần tiến hành xét nghiệm lại.
- Mẫu trắng blank < 0.25 OD
- Chứng âm phải âm tính.
- Sử dụng bảng để tính giá trị dao động trong khoảng cho phép của mẫu chuẩn SD standard serum đối với từng lô.
- OD của standard serum và cut off serum không được chênh quá 20%.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

Kết quả

- + Các giá trị OD dưới ngưỡng giới hạn dưới được đánh giá là: Âm tính.
- + Các giá trị trên ngưỡng giới hạn trên được đánh giá là: Dương tính.
- + Các giá trị nằm trong khoảng giới hạn cần được làm xét nghiệm lại, nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định

IgG: chỉ điểm đã từng có nhiễm virus hoặc sau tiêm chủng thành công.

- Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

- Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ số tỷ lệ pha loãng.
- Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.
- Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Các mẫu nhiễm khuẩn hoặc đã bất hoạt bởi nhiệt có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.
- Không sử dụng hoán đổi khay thuốc thử tích hợp giữa các loại máy xét nghiệm khác nhau. Sau khi mở, một bộ thuốc thử tích hợp chỉ được sử dụng trên một loại máy nhất định cho đến hết.
- Chất gây nhiễu: Các nghiên cứu có đối chứng về các chất/ tình trạng có nguy cơ gây nhiễu cho thấy đặc tính hiệu năng của xét nghiệm không bị ảnh hưởng bởi các chất chống đông (kali EDTA, natri heparin); tán huyết (nồng độ hemoglobin lên đến 1000 mg/dL); mỡ máu (nồng độ triglycerid lên đến 3000 mg/dL); tăng bilirubin máu (nồng độ bilirubin lên đến 20 mg/dL), tăng albumin máu (nồng độ

albumin lên đến 5,0 g/dL); hoặc tối đa 6 chu trình làm đông – rã đông mẫu. Việc sử dụng các mẫu huyết tương được chống đông bằng citrat làm giảm tín hiệu đo được, dẫn tới các kết quả bị đánh giá thấp hơn thực tế (khoảng 20%).

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT).
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

92. *Rickettsia tsutsugamushi* miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG/ IgM kháng *Orientia tsutsugamushi* (*Rickettsia tsutsugamushi*) trong huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- *Rickettsia tsutsugamushi* IgG: Kháng thể IgG kháng *Rickettsia tsutsugamushi*
- *Rickettsia tsutsugamushi* IgM: Kháng thể IgM kháng *Rickettsia tsutsugamushi*

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Rickettsia tsutsugamushi* IgG, IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Ống Falcon 5-15ml

- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh Cái
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Rickettsia tsutsugamushi* IgG, IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.

Các bước	Nội dung
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i> Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Rickettsia Ab trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Rickettsia Ab bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Cho 100µl chứng âm, chứng dương, bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng tương ứng.(Giếng A1 là giếng trống) Ủ ở 37°C trong 30 phút Rửa 6 lần: 300 µl dung dịch rửa/giếng/lần Cho 100µl Engyme conjugate/ giếng (trừ giếng trống) Ủ ở 37°C trong 30 phút Rửa 6 lần: 300 µl dung dịch rửa/giếng/lần Cho 150 µl dung dịch rửa (Wash solution) vào các giếng (trừ giếng trống) Đề 5 phút ở nhiệt độ phòng (20 – 25 độ)

Các bước	Nội dung
	Rửa 6 lần: 300 µl dung dịch rửa/giếng/lần Cho 100 µl dung dịch TMB (chất tạo màu) vào các giếng Đề 10 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng Cho 50 µl dung dịch dừng phản ứng (Stop solution) vào mỗi giếng. Đề 1 phút Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450 nm
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm

- Kết quả xét nghiệm được xem là hợp lệ nếu các thông số sau đáp ứng các điều kiện:
 - Giá trị chứng âm (NC) < 0.2
 - Giá trị chứng dương (PC) > 0.5
 - Tỷ lệ PC/NC > hoặc = 5

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, thử nghiệm là không hợp lệ và phải được thực hiện lại

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- Đọc kết quả và nhận định kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

* Tính giá trị ngưỡng:

- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (CO): Là tổng của giá trị trung bình chứng âm (OD) + 3 lần độ lệch chuẩn của chứng âm (SD)

* Diễn giải kết quả

Giá trị đo mẫu (OD)

- Nếu OD mẫu < giá trị ngưỡng (CO): Âm tính.
- Nếu OD > giá trị ngưỡng: Dương tính.

4.2.3. Quy định chạy lại xét nghiệm

- Tất cả các mẫu Dương tính đều phải chạy lại lần 2 để khẳng định
- Các mẫu có OD sát ngưỡng cũng phải chạy lại để khẳng định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

93. *Treponema pallidum* RPR định lượng hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình xét nghiệm RPR để định lượng kháng thể kháng lipid giang mai trong huyết thanh hoặc huyết tương người trên hệ thống máy miễn dịch tự động.

1.2. Định nghĩa, Nguyên lý

Nguyên lý ngưng kết hạt latex. Các hạt latex được gắn kháng nguyên tái tổ hợp hoặc kháng thể đơn dòng sẽ tạo ngưng kết khi có sự hiện diện của kháng thể hoặc kháng nguyên đặc hiệu có trong mẫu thử.

Định nghĩa:

- RPR: Rapid plasma Reagin.
- + Calibrators: Mẫu chuẩn.
- + Controls: Mẫu chứng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm RPR (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 10 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm RPR (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa. Chuẩn bị các hóa chất kèm theo Calibrator 1-5; Negative Control, Positive Control, Diluent NaCl 9%
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Calibration kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không, chạy hiệu chuẩn 5 điểm (S1: mẫu chuẩn RPR âm tính, mẫu chuẩn S2-5: mẫu chuẩn dương tính) Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn:. + Sau 1 tuần. + Sau khi đổi hộp. + Khi cần theo quy trình kiểm tra chất lượng.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên (nếu thấy cần thiết) thì tiến hành chạy chứng. Chuẩn bị các hóa chất kèm theo để chạy chứng âm và chứng dương. Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên thì tiến hành chạy chứng (chạy hàng ngày sau mỗi 24 h)
4	Chạy mẫu theo các bước sau
4.1	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.

Các bước	Nội dung
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 4.2 – 4.9:	
4.2	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng.
4.3	Vào màn hình Workplace → Test Selection
4.4	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
4.5	Chọn tên test là RPR
4.6	Vào Barcode Read Error
4.7	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
4.8	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần xét nghiệm (hoặc Sample Cup chứa mẫu bệnh phẩm) lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
4.9	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 4.10 – 4.12:	
4.10	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm (ví dụ Quản lý thông tin xét nghiệm)
4.11	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
4.12	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*

Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*

NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC

Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm, xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

+ Hệ thống máy tự động tính toán, phân tích nồng độ của từng mẫu xét nghiệm dựa trên giá trị độ đục đo được và giá trị chuẩn.

- + Giá trị đo được từ 0.5 – 8.0 RU.
- + Đối với ứng dụng định lượng, các mẫu trên 4.0 R.U phải được chạy lại sau khi pha loãng vì khả năng hiệu ứng prozone. Xác định những mẫu có nồng độ cao hơn thông qua chức năng chạy lại mẫu theo tỷ lệ 1:10. Kết quả được tự động nhân lên với hệ số 10.

Diễn giải kết quả

- + Dương tính: ≥ 1 R.U (1R.U = 0.4 IU)
- + Âm tính: < 1 R.U

Mẫu dương tính phải được lặp lại trên mẫu mới vào 1 ngày sau đó. Chẩn đoán dựa trên việc phối hợp các bằng chứng lâm sàng và xét nghiệm.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Một số bệnh nhân bị nhiễm có thể cho kết quả âm tính, đặc biệt trong giai đoạn sớm hoặc suy giảm miễn dịch.

Hiệu ứng mẫu bệnh phẩm có nồng độ cao: có thể xảy ra với nồng độ trên 14 R.U. Trong trường hợp mẫu có nồng độ cao mà âm tính (prozone), cần pha loãng mẫu bằng dung dịch NaCl 0.9% làm lại để cho kết quả chính xác.

Dương tính giả có thể xảy ra do phản ứng không đặc hiệu, phụ nữ có thai, bệnh nhân có bệnh tự miễn, bệnh nhân dùng các sản phẩm từ máu có chứa globulin miễn dịch.

Trong một số rất ít trường hợp bệnh lý miễn dịch kháng thể gammopathy đặc biệt typ IgM (Waldenstroms macroglobulinemia) có thể gây nên kết quả không xác thực.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

94. Vi khuẩn Ag miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng nguyên (Ag) của vi khuẩn trong phân của người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiệt trùng
- Ống Falcol 5-15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: phân của người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng
5	Chuẩn bị mẫu: Chuyển bàn chải đã lấy khoảng 0,2g phân vào ống nghiệm được cung cấp trong bộ xét nghiệm và sau đó thêm 1 ml Pha loãng mẫu. Giữ bàn chải bên trong ống, trộn mạnh trên máy lắc xoáy trong 1 phút +/- 10% để hòa tan H.pylori vào dung dịch Loại bỏ bàn chải và chèn pit-tông lọc, vào ống. Đẩy pit-tông nhẹ nhàng xuống vào ống để lấy không quá 150-200 ul của dịch nổi pha loãng, thể tích đủ để tiến hành xét nghiệm.
6	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
7	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất hiệu chuẩn và mẫu. Đề giếng A1 trống làm giếng trắng. Cho 100 µl chất hiệu chuẩn 1 (2 giếng), 100 µl chất hiệu chuẩn 2 (2 giếng), 100 µl chất hiệu chuẩn 4 (1 giếng) và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định
8	Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng, trừ A1(mẫu trắng)
9	Đậy nắp và ủ 120 phút ở nhiệt độ 37°C
10	Rửa phiên nhựa.
11	Cho 200 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
12	Ủ phiên nhựa, không đậy nắp và tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng (18-24°C) trong 20 phút
13	Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng.
14	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 20 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.

Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

- Kết quả $>$ giá trị ngưỡng: Dương tính
- Kết quả $<$ giá trị ngưỡng: Âm tính
- Kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

95. *Helicobacter pylori* Ag miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện xác định tính kháng nguyên *Helicobacter pylori* (HP Ag) trong phân người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Nguyên lý:** Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

- Định nghĩa:

- + CAL 0 (Calibrator 0): Chất hiệu chuẩn 0 µg/ml
- + CAL 0.1 (Calibrator 0.1): Chất hiệu chuẩn 0.1 µg/ml

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HP Ag (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 µL tiết trùng
- Đầu côn 1-200 µL tiết trùng
- Ống Falcon 5-15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm Cái
- Cốc đong 500ml, 1000ml Cái

- Panh Cái
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA Cái
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân tươi của bệnh nhân tránh tiếp xúc với nước tiểu hoặc nước.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Bộ sinh phẩm HP Ag (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng
5	Chuẩn bị mẫu: Chuyển bàn chải đã lấy khoảng 0,2g phân vào ống nghiệm được cung cấp trong bộ xét nghiệm và sau đó thêm 1 ml Pha loãng mẫu. Giữ bàn chải bên trong ống, trộn mạnh trên máy lắc xoay trong 1 phút +/- 10% để hòa tan H.pylori vào dung dịch Loại bỏ bàn chải và chèn pit-tông lọc, vào ống. Đẩy pit-tông nhẹ nhàng xuống vào ống để lấy không quá 150-200 ul của dịch nổi pha loãng, thể tích đủ để tiến hành xét nghiệm.
6	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
7	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất hiệu chuẩn và mẫu. Đề giếng A1 trống làm giếng trắng. Cho 100 µl chất hiệu chuẩn 1 (2 giếng), 100 µl chất hiệu chuẩn 2 (2 giếng), 100 µl chất hiệu chuẩn 4 (1 giếng) và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định
8	Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng, trừ A1(mẫu trắng)
9	Đậy nắp và ủ 120 phút ở nhiệt độ 37°C
10	Rửa phiến nhựa.
11	Cho 200 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
12	Ủ phiến nhựa, không đậy nắp và tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng (18-24°C) trong 20 phút
13	Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng.
14	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 20 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm

Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt yêu cầu.

Điều kiện của phản ứng:

- Kiểm tra tính hợp lệ được thực hiện trên chất chứng/chất hiệu chuẩn bất cứ khi nào bộ xét nghiệm được sử dụng để xác minh OD450 nm mong đợi hoặc giá trị S/CO đáp ứng trong phép phân tích.
- Đảm bảo:

Thông số	Yêu cầu
Giếng trắng	< 0.100 Giá trị OD450nm
Chất hiệu chuẩn 0 ug/ml	< 0.200 Giá trị trung bình OD450nm sau khi chạy mẫu trắng
Chất hiệu chuẩn 0.1 ug/ml	OD450nm > OD450nm Chất hiệu chuẩn 0 ug/ml + 0.100
Chất hiệu chuẩn 1 ug/ml	> 1.000 Giá trị OD450nm

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải kiểm tra và làm lại xét nghiệm

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- Đọc kết quả và nhận định kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các kết quả xét nghiệm được tính toán bằng phương pháp giá trị ngưỡng được cài đặt trên máy tự động bằng cách: xác định từ giá trị OD450nm của chất hiệu chuẩn 0 µg/ml (CAL 0) và chất hiệu chuẩn 0.1 ug/ml (CAL 0.1) theo công thức sau:

$$\text{Giá trị ngưỡng} = (\text{CAL 0} + \text{CAL 0.1}) / 2$$

Đối với xét nghiệm định tính, kết quả xét nghiệm được giải thích dựa vào tỷ số của mẫu (S) và giá trị ngưỡng (CO), ký hiệu toán học là S/CO, như sau:

S/CO < 1: Âm tính

S/CO : 1- 1.1: Nghi ngờ → Cần xét nghiệm lần 2. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định.

S/CO > 1.1: Dương tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

ngoctlv.kcb - Truong Le Van Ngoc - 04/09/2023 - 16:23:00

96. Vi khuẩn Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính/ định lượng kháng thể (Ab) của vi khuẩn bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiệt trùng
- Ống Falcol 5-15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (3 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Leptospira* IgM/IgG (Ví dụ hoặc tương đương)

Các bước	Xét nghiệm định tính
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
5	Nhỏ dung dịch pha loãng, mẫu, chứng vào giếng.
6	Trộn đều hoặc lắc phiến vi lượng sau khi thực hiện bước hút nhỏ
7	Đậy tấm và ủ.
8	Rửa phiến nhựa.
9	Chuẩn bị chất cộng hợp
10	Nhỏ dung dịch chất cộng hợp vào tất cả các giếng
11	Đậy tấm và ủ.
12	Rửa phiến nhựa
13	Chuẩn bị dung dịch hiện màu
14	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
15	Ủ phiến nhựa. Không đậy tấm và tránh ánh sáng
16	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
17	Đọc độ hấp thụ sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

- Kết quả $>$ giá trị ngưỡng: Dương tính
- Kết quả $<$ giá trị ngưỡng: Âm tính
- Kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

97. *Bordetella pertussis* IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng *Bordetella pertussis* trong huyết thanh/ huyết tương của người để chẩn đoán bệnh ho gà hoặc kiểm tra đáp ứng miễn dịch sau tiêm phòng vacxin ho gà.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng *Bordetella pertussis*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng *Bordetella pertussis* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Bordetella pertussis* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được định lượng bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng *Bordetella pertussis* gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng(pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) 10µl -200 µl tiệt trùng
- Đầu côn (tip)1000 µl tiệt trùng
- Ống nghiệm nhựa 3-5ml không nắp
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm

- Chai thủy tinh Duran
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA bán tự động bao gồm:
 - + Máy ủ (khoảng nhiệt độ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$),
 - + Máy rửa khay vi giếng 8 x 12 hàng
 - + Máy đọc, bước sóng 405nm – 630nm
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy vortex để trộn các hoá chất, và trộn đều mẫu khi pha loãng
- Bộ pipette tự động các kích cỡ từ 10 μl đến 1000 μl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Tủ lạnh 2°C - 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố $< 2.0 \text{ g/L}$, lipid/triglyceride $< 11.5 \text{ g/L}$, bilirubin $< 0.201 \text{ g/L}$

- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất xuất và quy trình của phòng xét nghiệm

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số sinh phẩm cần thực hiện gắn vào giá đỡ
5	Pha loãng bệnh phẩm
6	Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng
7	Đậy và ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp
8	Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa
9	Nhỏ dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzyme) vào các giếng
10	Đậy và ủ giếng lần thứ hai
11	Rửa giếng
12	Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng
13	Ủ giếng lần thứ 3 (lưu ý tránh ánh sáng)
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng

16	Nhập kết quả đo được vào phần mềm tính toán theo hướng dẫn của nhà sản xuất
17	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phân giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Tắc kim máy rửa, dẫn đến rửa bẩn.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Máy ủ không đạt nhiệt độ yêu cầu. + Máy đo quang bị hỏng.	- Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn. - Kết quả dương tính không phân biệt được do đáp ứng miễn dịch sau tiêm chủng hay nhiễm tự nhiên.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp - Cần phân tích kết quả kết hợp triệu chứng lâm sàng và các xét nghiệm khác.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

98. *Bordetella pertussis* IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgM kháng *Bordetella pertussis* trong huyết thanh/ huyết tương của người để chẩn đoán nhiễm vi khuẩn ho gà.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgM kháng *Bordetella pertussis*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgM kháng *Bordetella pertussis* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Bordetella pertussis* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgM gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgM kháng *Bordetella pertussis* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) 10µl -200 µl tiệt trùng
- Đầu côn (tip) 1000 µl tiệt trùng
- Ống nghiệm nhựa 3-5ml không nắp
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Chai thủy tinh Duran

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA bán tự động bao gồm:
 - + Máy ủ (khoảng nhiệt độ $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)
 - + Máy rửa khay vi giếng 8 x 12 hàng
 - + Máy đọc, bước sóng 405nm – 630nm
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy vortex để trộn các hoá chất, và trộn đều mẫu khi pha loãng
- Bộ pipette tự động các kích cỡ từ 10 μl đến 1000 μl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố $< 2.0 \text{ g/L}$, lipid/triglyceride $< 11.5 \text{ g/L}$, bilirubin $< 0.201 \text{ g/L}$
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất xuất và quy trình của phòng xét nghiệm

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số sinh phẩm cần thực hiện gắn vào giá đỡ
5	Pha loãng bệnh phẩm
6	Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng
7	Đậy và ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp
8	Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa
9	Nhỏ dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzyme) vào các giếng
10	Đậy và ủ giếng lần thứ hai
11	Rửa giếng
12	Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng
13	Ủ giếng lần thứ 3 (lưu ý tránh ánh sáng)
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng
16	Nhập kết quả đo được vào phần mềm tính toán theo hướng dẫn của nhà sản xuất
17	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phân giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Tắc kim máy rửa, dẫn đến rửa bẩn. - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Máy ủ không đạt nhiệt độ yêu cầu. + Máy đo quang bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

99. *Chlamydia trachomatis* IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgG đối với *Chlamydia trachomatis* trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Nguyên lý:** Xác định định tính, định lượng kháng thể IgG dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

- Định nghĩa:

- + *Chlamydia trachomatis* IgG: Kháng thể IgG với *Chlamydia trachomatis*.
- + *Chlamydia trachomatis* IgM: Kháng thể IgM với *Chlamydia trachomatis*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

Bộ sinh phẩm xét nghiệm ELISA *Chlamydia trachomatis* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiết trùng
- Tuýp 5-15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất..

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Chlamydia trachomatis* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Để sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng (đối với IgG: 1 bệnh phẩm +100 dilution buffer DILB) vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2...
5	Ủ 60 phút (± 5 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
6	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
7	Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank.
8	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
9	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
10	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank
11	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
12	Nhỏ 100µl dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tấm.
13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút bằng máy đọc ELISA.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm:

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Giá trị các chứng và chuẩn nằm trong giới hạn cho phép đã được chứng nhận kèm theo lô sản phẩm. Nếu giá trị này nằm ngoài khoảng thì cần tiến hành xét nghiệm lại.
- Mẫu trắng blank < 0.25 OD
- Chứng âm phải âm tính.
- Sử dụng bảng để tính giá trị dao động trong khoảng cho phép của mẫu chuẩn SD standard serum đối với từng lô.
- OD của standard serum và cut off serum không được chênh quá 20%.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

- Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.
 - + Âm tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm < Khoảng giá trị ngưỡng.
 - + Dương tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm > Khoảng giá trị ngưỡng.
- Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

- Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ số tỷ lệ pha loãng.
- Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng.
- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường:
 - + Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.
 - + IgG: Xuất hiện sau 6 đến 8 tuần sau nhiễm *Chlamydia trachomatis*. Nồng độ IgG giảm chậm và có thể còn tồn tại nhiều năm sau đó.
 - + Các phản ứng chéo có thể giữa các tác nhân gây bệnh khác như *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

100. *Chlamydia trachomatis* IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgM đối với *Chlamydia trachomatis* trong huyết thanh hoặc huyết tương người. *Chlamydia trachomatis* IgM khuyến cáo để xác định nhiễm virus cấp bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) .

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Nguyên lý:** Xác định định tính, định lượng kháng thể IgM dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.
- **Định nghĩa:**
 - + *Chlamydia trachomatis* IgG: Kháng thể IgG với *Chlamydia trachomatis*.
 - + *Chlamydia trachomatis* IgM: Kháng thể IgM với *Chlamydia trachomatis*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Chlamydia trachomatis* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 5-15 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Chlamydia trachomatis* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Để sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Đối với IgM cần làm thêm: Hấp phụ yếu tố thấp: (pha Rf-absorbent RF (V1) + dilution buffer DILB (V2) = 1 + 4 = Rf-dilution buffer (V3) (200 µl Rf-absorbent RF + 800 µl dilution buffer DILB); pha loãng bệnh phẩm V4+V3 = 1+100 (10 µl bệnh phẩm + 1000 µl Rf-dilution buffer yếu tố thấp đã pha). Ủ bệnh phẩm đã xử lý trên 15 phút ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2.
5	Ủ 60 phút (±5 phút) ở 37°C (± 1°C) trong tủ ấm.
6	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
7	Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank.
8	Ủ 30 phút (±1 phút) ở 37°C(± 1°C) trong tủ ấm.
9	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
10	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank
11	Ủ 30 phút (±1 phút) ở 37°C(± 1°C) trong tủ ấm.

12	Nhỏ 100 μ l dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tấm.
13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút bằng máy đọc ELISA.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm:

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.
- Giá trị các chứng và chuẩn nằm trong giới hạn cho phép đã được chứng nhận kèm theo lô sản phẩm. Nếu giá trị này nằm ngoài khoảng thì cần tiến hành xét nghiệm lại.
- Mẫu trắng blank < 0.25 OD
- Chứng âm phải âm tính.
- Sử dụng bảng để tính giá trị dao động trong khoảng cho phép của mẫu chuẩn SD standard serum đối với từng lô.
- OD của standard serum và cut off serum không được chênh quá 20%.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.
 - + Âm tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm < Khoảng giá trị ngưỡng.
 - + Dương tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm > Khoảng giá trị ngưỡng.
 - + Không xác định: khi giá trị mẫu bệnh phẩm nằm trong khoảng ranh giới cần làm lại xét nghiệm, nếu kết quả chạy lại vẫn không thể kết luận được âm tính hay dương tính thì trả kết quả không xác định.

IgM xuất hiện trong nhiễm *Chlamydia trachomatis* lần đầu.

Các phản ứng chéo có thể giữa các tác nhân gây bệnh khác như *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*.

- Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ sở tỷ lệ pha loãng.

Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chủng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.

- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

101. *Chlamydia pneumoniae* IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể IgG kháng *Chlamydia pneumoniae* trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KN hoặc KT hoặc KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Chlamydia pneumoniae* IgG (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiệt trùng
- Ống Falcon 5-15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Chlamydia pneumoniae* IgG (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Cho 100 µl chứng (1 giếng trống, 1 chứng âm, 2 giếng chuẩn) và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình.
7	Đậy nắp và ủ. Ủ mẫu trong 60 phút (+/- 5 phút) ở 37 °C (+/- 1 °C) trong máy ủ ấm
8	Rửa phiến nhựa.
9	Cho 100 µl cộng hợp vào các giếng (trừ giếng trống)
10	Đậy nắp và ủ trong 30 phút (+/- 1 phút) ở 37 °C (+/- 1 °C) trong máy ủ ấm.
11	Rửa phiến nhựa
12	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
13	Ủ phiến nhựa trong 30 phút (+/- 1 phút) ở 37 °C (+/- 1 °C) trong máy ủ ấm, không đậy nắp và tránh ánh sáng
14	Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, lắc nhẹ khay để trộn
15	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 405 và 650nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt yêu cầu.

Kết quả được đọc trên máy đọc ELISA như sau:

- OD giếng trống phải < 0.25
- Chứng âm phải cho kết quả âm tính.
- Giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình của huyết thanh chuẩn phải trong khoảng tham chiếu hợp lệ ghi trong Giấy kiểm tra chất lượng bộ kit (Sau khi trừ đi độ hấp thụ của giếng trống).
- Sự dao động giá trị OD của huyết thanh chuẩn không được cao hơn 20%.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả.

Đánh giá xét nghiệm dựa trên giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng đặc hiệu số lô với đường chuẩn có trong các bộ thuốc thử để các giá trị OD thu được có thể phản ánh sự hoạt động của kháng thể tương ứng. Giá trị OD của giếng trống phải được trừ ra trước khi tính toán.

Trong dòng đầu tiên của bảng, khoảng giá trị OD cho huyết thanh chuẩn được mô tả bao gồm toàn bộ khoảng hiệu lực cho chất chuẩn. Theo giá trị OD trung bình đo được của huyết thanh chuẩn, có thể chọn cột tương ứng. Cột này chứa thông tin về các giá trị OD ngưỡng trên và dưới để cho phép đánh giá mẫu bệnh nhân.

- Các giá trị OD dưới ngưỡng giới hạn dưới được đánh giá là: Âm tính.
- Các giá trị trên ngưỡng giới hạn trên được đánh giá là: Dương tính.
- Các giá trị nằm trong khoảng giới hạn cần được làm xét nghiệm lại, nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định,

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.

- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

102. *Chlamydia pneumoniae* IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể IgM kháng *Chlamydia pneumoniae* trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Chlamydia pneumoniae* IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 µL tiết trùng
- Đầu côn 1-200 µL tiết trùng
- Đầu côn 1-20 µL tiết trùng
- Ống Falcon 5-15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm

- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm *Chlamydia pneumoniae* IgM (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Cho 100 µl chứng (1 giếng trống, 1 chứng âm, 2 giếng chuẩn) và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình.
7	Đậy nắp và ủ. Ủ mẫu trong 60 phút (+/- 5 phút) ở 37 °C (+/- 1 °C) trong máy ủ ấm
8	Rửa phiến nhựa.
9	Cho 100 µl cộng hợp vào các giếng (trừ giếng trống)
10	Đậy nắp và ủ trong 30 phút (+/- 1 phút) ở 37 °C (+/- 1 °C) trong máy ủ ấm.
11	Rửa phiến nhựa
12	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
13	Ủ phiến nhựa trong 30 phút (+/- 1 phút) ở 37 °C (+/- 1 °C) trong máy ủ ấm, không đậy nắp và tránh ánh sáng
14	Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, lắc nhẹ khay để trộn
15	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 405 và 650nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt yêu cầu.

Kết quả được đọc trên máy đọc ELISA như sau:

- OD giếng trống phải < 0.25
- Chứng âm phải cho kết quả âm tính.
- Giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình của huyết thanh chuẩn phải trong khoảng tham chiếu hợp lệ ghi trong Giấy kiểm tra chất lượng bộ kit (Sau khi trừ đi độ hấp thụ của giếng trắng).
- Sự dao động giá trị OD của huyết thanh chuẩn không được cao hơn 20%.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Đánh giá xét nghiệm dựa trên giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng đặc hiệu số lô với đường chuẩn có trong các bộ thuốc thử để các giá trị OD thu được có thể phản ánh sự hoạt động của kháng thể tương ứng. Giá trị OD của giếng trống phải được trừ ra trước khi tính toán.

Trong dòng đầu tiên của bảng, khoảng giá trị OD cho huyết thanh chuẩn được mô tả bao gồm toàn bộ khoảng hiệu lực cho chất chuẩn. Theo giá trị OD trung bình đo được của huyết thanh chuẩn, có thể chọn cột tương ứng. Cột này chứa thông tin về các giá trị OD ngưỡng trên và dưới để cho phép đánh giá mẫu bệnh nhân.

- Các giá trị OD dưới ngưỡng giới hạn dưới được đánh giá là: Âm tính.
- Các giá trị trên ngưỡng giới hạn trên được đánh giá là: Dương tính.
- Các giá trị nằm trong khoảng giới hạn cần được làm xét nghiệm lại, nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

103. *Helicobacter pylori* Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định định lượng và định tính các kháng thể kháng *Helicobacter pylori* (HP) trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Helicobacter pylori* IgA/ IgG / IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Ống Falcon 5-15 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm Cái
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml Cái

- Cốc đong 500ml, 1000ml Cái
- Bông tiêm Kg
- Panh Cái
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA Cái
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất..

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Helicobacter pylori* IgA/ IgG / IgM (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i> Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Helicobacter pylori</i> IgA/ IgG / IgM (VD hoặc tương đương) trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp.

Các bước	Nội dung
	Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Helicobacter pylori</i> IgA/ IgG / IgM (VD hoặc tương đương) bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Cho 100 µl mẫu đã pha loãng (mẫu đã được hấp phụ yếu tố dạng thấp với xét nghiệm phát hiện kháng thể IgM) hoặc chất chứng sẵn sàng sử dụng vào các giếng thích hợp của thanh vi giếng. Để trống 1 giếng trống. Ủ mẫu trong 60 phút (+/- 5 phút) tại 37°C (+/-1 °C) Rửa toàn bộ các giếng với dung dịch rửa Thêm 100 µl chất cộng hợp IgA/IgG/IgM sẵn sàng sử dụng vào các giếng thích hợp (trừ giếng trống). Ủ chất cộng hợp trong 30 phút (+/- 1 phút) ở 37°C (+/- 1°C) Rửa tất các giếng bằng dung dịch rửa sau khi ủ Thêm 100 µl dung dịch cơ chất sẵn sàng sử dụng cho mỗi giếng Ủ cơ chất trong 30 phút (+/- 1 phút) ở 37°C (+/- 1°C) Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, lắc các giếng Đọc kết quả OD trong 60 phút ở bước sóng 405nm dựa vào giếng trống, tham khảo bước sóng từ 620nm đến 690 nm
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập

Các bước	Nội dung
	tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy Evolis.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm

- Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt yêu cầu
 - + Giếng trống < 0.25 OD.
 - + Chứng âm phải cho kết quả âm tính.
 - + Giá trị OD trung bình (Sau khi trừ đi độ hấp thụ của giếng trống) của huyết thanh chuẩn phải nằm trong khoảng tham chiếu cho phép, được chứng minh trong giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng theo lô cụ thể.
 - + Sự biến động giá trị OD của huyết thanh chuẩn không được cao hơn 20%.
- Nếu các tiêu chí này không được đáp ứng, các xét nghiệm là không hợp lệ và phải được làm lại.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- Đọc kết quả và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các kết quả xét nghiệm được tính toán được cài đặt trên máy tự động bằng cách:

Sử dụng phần mềm tính toán tự động tín hiệu quang học đo được.

Đánh giá xét nghiệm dựa trên giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng đặc hiệu số lô với đường chuẩn có trong các bộ thuốc thử để các giá trị OD thu được có thể phản ánh sự hoạt động của kháng thể tương ứng. Giá trị OD của giếng trống phải được trừ ra trước khi tính toán.

Trong dòng đầu tiên của bảng, khoảng giá trị OD cho huyết thanh chuẩn được mô tả bao gồm toàn bộ khoảng hiệu lực cho chất chuẩn. Theo giá trị OD trung bình đo được của huyết thanh chuẩn, có thể chọn cột tương ứng. Cột này chứa thông tin về các giá trị OD ngưỡng trên và dưới để cho phép đánh giá mẫu bệnh nhân.

- Các giá trị OD dưới ngưỡng giới hạn dưới được đánh giá là: Âm tính.
- Các giá trị trên ngưỡng giới hạn trên được đánh giá là: Dương tính.

- Các giá trị nằm trong khoảng giới hạn cần được làm xét nghiệm lại, nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

104. *Leptospira* IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgG đối với *Leptospira spp.* trong huyết thanh hoặc huyết tương người. Xét nghiệm *Leptospira* IgG khuyến cáo để xác định trạng thái miễn dịch bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Nguyên lý:** Xác định định tính, định lượng kháng thể IgG dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.
- **Định nghĩa:**
 - + *Leptospira* IgM: Kháng thể IgM với *Leptospira*.
 - + *Leptospira* IgG: Kháng thể IgG với *Leptospira*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Leptospira* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 5-15 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Leptospira* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng (đối với IgG: 1 bệnh phẩm +100 dilution buffer DILB) vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2
5	Ủ 60 phút (± 5 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
6	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
7	Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank.
8	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
9	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
10	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank
11	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
12	Nhỏ 100µl dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tấm.

13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút bằng máy đọc ELISA.
----	---

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC

Giá trị các chứng và chuẩn nằm trong giới hạn cho phép đã được chứng nhận kèm theo lô sản phẩm. Nếu giá trị này nằm ngoài khoảng thì cần tiến hành xét nghiệm lại.

Mẫu trắng blank < 0.25 OD

Chứng âm phải âm tính.

Sử dụng bảng để tính giá trị dao động trong khoảng cho phép của mẫu chuẩn SD standard serum đối với từng lô.

OD của standard serum và cut off serum không được chênh quá 20%.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

IgG: chỉ điểm đã từng có nhiễm virus hoặc sau tiêm chủng thành công.

+ Âm tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm < Khoảng giá trị ngưỡng.

+ Dương tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm > Khoảng giá trị ngưỡng.

- Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ sở tỷ lệ pha loãng.

Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường:

Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

87,5% có sự tăng hàm lượng kháng thể IgG sau 2 hoặc 3 tháng. Một số không có đáp ứng IgG. Độ hoạt tính của IgG biểu thị sự nhiễm trùng với *Leptospira*.

- Làm lại xét nghiệm khi kết quả ở mức ngưỡng “grey zone”, không xác định được kết quả âm tính hoặc dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo..

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

105. *Leptospira* IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgM đối với *Leptospira spp.* trong huyết thanh hoặc huyết tương người. Xét nghiệm *Leptospira* IgM khuyến cáo để xác định nhiễm *Leptospira* cấp tính.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Nguyên lý:** Xác định định tính, định lượng kháng thể IgM dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.
- **Định nghĩa:**
 - + *Leptospira* IgM: Kháng thể IgM với *Leptospira*.
 - + *Leptospira* IgG: Kháng thể IgG với *Leptospira*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Leptospira* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Leptospira* IgG/IgM (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Đối với IgM cần làm thêm: Hấp phụ yếu tố thấp: (pha Rf-absorbent RF (V1) + dilution buffer DILB (V2) = 1 + 4 = Rf-dilution bufer (V3) (200 µl Rf-absorbent RF + 800 µl dilution buffer DILB); pha loãng bệnh phẩm V4+V3 = 1+100 (10 µl bệnh phẩm + 1000 µl Rf-dilution bufer yếu tố thấp đã pha). Ủ bệnh phẩm đã xử lý trên 15 phút ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2.
5	Ủ 60 phút (±5 phút) ở 37°C (± 1°C) trong tủ ấm.
6	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
7	Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank.
8	Ủ 30 phút (±1 phút) ở 37°C (± 1°C) trong tủ ấm.
9	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
10	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank
11	Ủ 30 phút (±1 phút) ở 37°C (± 1°C) trong tủ ấm.

Các bước	Nội dung
12	Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tăm.
13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút bằng máy đọc ELISA.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Giá trị các chứng và chuẩn nằm trong giới hạn cho phép đã được chứng nhận kèm theo lô sản phẩm. Nếu giá trị này nằm ngoài khoảng thì cần tiến hành xét nghiệm lại.

Mẫu trắng blank < 0.25 OD

Chứng âm phải âm tính.

Sử dụng bảng để tính giá trị dao động trong khoảng cho phép của mẫu chuẩn SD standard serum đối với từng lô.

OD của standard serum và cut off serum không được chênh quá 20%.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

IgM xuất hiện trong nhiễm *Leptospira* cấp, có thể phát hiện sớm nhất 2 ngày sau từ khi có triệu chứng và vẫn còn phát hiện được trong 5 tháng nữa ở tất cả các bệnh nhân.

+ Âm tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm < Khoảng giá trị ngưỡng.

+ Dương tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm > Khoảng giá trị ngưỡng.

- Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ số tỷ lệ pha loãng.

Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường
Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.
- Làm lại xét nghiệm khi kết quả ở mức ngưỡng “grey zone”, không xác định được kết quả âm tính hoặc dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.

- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

106. *Legionella pneumophila* IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng *Legionella pneumophila* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng *Legionella pneumophila*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng *Legionella pneumophila* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Legionella pneumophila* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng *Legionella pneumophila* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) 10µl -200 µl tiệt trùng
- Đầu côn (tip) 1000 µl tiệt trùng
- Ống nghiệm nhựa 3-5ml không nắp
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Chai thủy tinh Duran

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA bán tự động bao gồm:
 - + Máy ủ (khoảng nhiệt độ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$),
 - + Máy rửa khay vi giếng 8 x 12 hàng
 - + Máy đọc, bước sóng 405nm – 630nm
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy vortex để trộn các hoá chất, và trộn đều mẫu khi pha loãng
- Bộ pipette tự động các kích cỡ từ 10 μl đến 1000 μl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.4 Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố $< 2.0 \text{ g/L}$, lipid/triglyceride $< 11.5 \text{ g/L}$, bilirubin $< 0.201 \text{ g/L}$
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất xuất và quy trình của phòng xét nghiệm

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số sinh phẩm cần thực hiện gắn vào giá đỡ
5	Pha loãng bệnh phẩm
6	Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng
7	Đậy và ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp
8	Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa
9	Nhỏ dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzyme) vào các giếng
10	Đậy và ủ giếng lần thứ hai
11	Rửa giếng
12	Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng
13	Ủ giếng lần thứ 3 (lưu ý tránh ánh sáng)
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng
16	Nhập kết quả đo được vào phần mềm tính toán theo hướng dẫn của nhà sản xuất

17	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị
----	---

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phân giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Tắc kim máy rửa, dẫn đến rửa bẩn. - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
+ Máy ủ không đạt nhiệt độ yêu cầu. + Máy đo quang bị hỏng.	
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

107. *Legionella pneumophila* IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgM kháng *Legionella pneumophila* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgM kháng *Legionella pneumophila*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgM kháng *Legionella pneumophila* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Legionella pneumophila* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgM gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgM kháng *Legionella pneumophila* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Vật tư tiêu hao, vật tư thay thế
- Vật tư tiêu hao
- Đầu côn (tip) 10µl -200 µl tiệt trùng
- Đầu côn (tip) 1000 µl tiệt trùng
- Ống nghiệm nhựa 3-5ml không nắp
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- Vật tư thay thế
- Khay đựng bệnh phẩm

- Chai thủy tinh Duran
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Vật tư thay thế khác
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/ kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA bán tự động bao gồm:
 - + Máy ủ (khoảng nhiệt độ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$),
 - + Máy rửa khay vi giếng 8 x 12 hàng
 - + Máy đọc, bước sóng 405nm – 630nm
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy vortex để trộn các hoá chất, và trộn đều mẫu khi pha loãng
- Bộ pipette tự động các kích cỡ từ 10 μl đến 1000 μl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.4 Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1ml.

- + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride < 11.5 g/L, bilirubin < 0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy trình của phòng xét nghiệm

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số sinh phẩm cần thực hiện gắn vào giá đỡ
5	Pha loãng bệnh phẩm
6	Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng
7	Đậy và ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp
8	Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa
9	Nhỏ dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzyme) vào các giếng
10	Đậy và ủ giếng lần thứ hai
11	Rửa giếng
12	Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng
13	Ủ giếng lần thứ 3 (lưu ý tránh ánh sáng)

Các bước	Nội dung
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng
16	Nhập kết quả đo được vào phần mềm tính toán theo hướng dẫn của nhà sản xuất
17	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định

SAI SÓT	XỬ TRÍ
+ Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Tắc kim máy rửa, dẫn đến rửa bẩn. - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Máy ủ không đạt nhiệt độ yêu cầu. + Máy đo quang bị hỏng.	- Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cẩn cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

108. *Rickettsia tsutsugamushi* miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG/ IgM kháng *Orientia tsutsugamushi* (*Rickettsia tsutsugamushi*) trong huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- + *Rickettsia tsutsugamushi* IgG: Kháng thể IgG kháng *Rickettsia tsutsugamushi*
- + *Rickettsia tsutsugamushi* IgM: Kháng thể IgM kháng *Rickettsia tsutsugamushi*

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Rickettsia tsutsugamushi* IgG/ IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiết trùng
- Ống Falcon 5-15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm Cái

- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh Cái
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Rickettsia tsutsugamushi* IgG, IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị đủ số giếng cần sử dụng.
4	Pha dung dịch rửa: Pha dung dịch rửa bằng nước cất với tỷ lệ 120ml dung dịch rửa + 1080ml nước cất 2 lần.
5	- Pha loãng mẫu theo tỷ lệ 1/100 dung dịch pha loãng (4µl mẫu + 396µl dung dịch pha loãng)
6	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
7	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhập đúng vào biểu tượng chương trình.
8	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
9	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào máy + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào máy và chọn test sử dụng.
10	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình.
10.1	Cho 100µl chứng âm, chứng dương, bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng tương ứng. (Giếng A1 là giếng trống).

Các bước	Nội dung
10.2	Ủ ở 37 °C trong 30 phút
10.3	Rửa 6 lần: 300 µl dung dịch rửa/giếng/lần . Thấm khô.
10.4	Cho 100µl Engyme conjugate/ giếng (trừ giếng trống). Đậy nắp.
10.5	Ủ ở 37 °C trong 30 phút
10.6	Rửa 6 lần: 300 µl dung dịch rửa/giếng/lần . Thấm khô.
10.7	Cho 150 µl dung dịch rửa (Wash solution) vào các giếng (trừ giếng trống). Không đậy nắp.
10.8	Đề 5 phút ở nhiệt độ phòng (20 – 25 độ)
10.9	Rửa 6 lần: 300 µl dung dịch rửa/giếng/lần . Thấm khô.
10.10	Cho 100 µl dung dịch TMB (chất tạo màu) vào các giếng. Không đậy nắp.
10.11	Đề 10 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.
10.12	Cho 50 µl dung dịch dừng phản ứng (Stop solution) vào mỗi giếng. Đề 1 phút. Không đậy nắp.
10.13	Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450 nm.
11	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
12	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tấm ra sau khi chạy máy xong.
13	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
14	Tắt máy tính.
15	Tắt máy hệ thống Elisa bán tự động.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Kết quả xét nghiệm được xem là hợp lệ nếu các thông số sau đáp ứng các điều kiện:
 - Giá trị chứng âm (NC) < 0.2

- Giá trị chứng dương (PC) > 0.5
- Tỷ lệ PC/NC $>$ hoặc $= 5$
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, thử nghiệm là không hợp lệ và phải được thực hiện lại.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

* Tính giá trị ngưỡng

- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (CO): Là tổng của giá trị trung bình chứng âm (OD) + 3 lần độ lệch chuẩn của chứng âm (SD)

* Diễn giải kết quả

Giá trị đo mẫu (OD)

- Nếu OD mẫu $<$ giá trị ngưỡng (CO): Âm tính.
- Nếu OD $>$ giá trị ngưỡng: Dương tính.

4.2.3. Quy định chạy lại xét nghiệm

- Tất cả các mẫu Dương tính đều phải chạy lại lần 2 để khẳng định
- Các mẫu có OD sát ngưỡng cũng phải chạy lại để khẳng định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Cơ thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

109. Vi khuẩn Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng nguyên của vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm từ người kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- CAL 0 (Calibrator 0) : Chất hiệu chuẩn 0 $\mu\text{g/ml}$
- CAL 0.1 (Calibrator 0.1) : Chất hiệu chuẩn 0.1 $\mu\text{g/ml}$
- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μL tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μL tiết trùng
- Đầu côn 1000 μL tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μL tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Ống Falcon 4-15 ml
- Khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm từ người (VD: Phân hoặc huyết thanh, huyết tương người...)
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị chất chuẩn, dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Chuẩn bị mẫu: Chuyển bàn chải đã lấy khoảng 0,2g phân vào ống nghiệm được cung cấp trong bộ xét nghiệm và sau đó thêm 1 ml Pha loãng mẫu. Giữ bàn chải bên trong ống, trộn mạnh trên máy lắc xoay trong 1 phút +/- 10% để hòa tan mẫu vào dung dịch. Loại bỏ bàn chải và chèn pit-tông lọc, vào ống. Đẩy pit-tông nhẹ nhàng xuống vào ống để lấy không quá 150-200 ul của dịch nổi pha loãng, thể tích đủ để tiến hành xét nghiệm.
5	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
6	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
7	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy:

	Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
8	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i> Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm kháng nguyên vi khuẩn cần làm trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm kháng nguyên vi khuẩn cần làm bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
9	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Đổ giếng A1 trống làm giếng trắng. Cho 100 µl chất hiệu chuẩn 1 (2 giếng), 100 µl chất hiệu chuẩn 2 (2 giếng), 100 µl chất hiệu chuẩn 4 (1 giếng) và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định. Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng, trừ A1(mẫu trắng)

	Ủ 120 phút ở nhiệt độ 37°C Rửa phiên nhựa Cho 200 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng Ủ phiên nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng (18-24°C) trong 20 phút Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 20 phút sau khi dừng phản ứng
10	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
11	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
12	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
13	Tắt máy tính.
14	Tắt máy xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

- Kết quả > giá trị ngưỡng: Dương tính
- Kết quả < giá trị ngưỡng: Âm tính
- Kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Trong một số rất ít trường hợp bệnh lý miễn dịch kháng thể gammopathy đặc biệt typ IgM (Waldenstroms macroglobulinemia) có thể gây nên kết quả không xác thực.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

110. *Helicobacter pylori* Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện xác định tính kháng nguyên *Helicobacter pylori* (HP Ag) trong phân người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Nguyên lý:** Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

- Định nghĩa:

- + CAL 0 (Calibrator 0) : Chất hiệu chuẩn 0 µg/ml
- + CAL 0.1 (Calibrator 0.1) : Chất hiệu chuẩn 0.1 µg/ml

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HP Ag (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 µL tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 µL tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Đầu côn 1000 µL tiết trùng
- Đầu côn 1-200 µL tiết trùng
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Bộ sinh phẩm HP Ag (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị chất chuẩn, dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Chuẩn bị mẫu: Chuyển bàn chải đã lấy khoảng 0,2g phân vào ống nghiệm được cung cấp trong bộ xét nghiệm và sau đó thêm 1 ml Pha loãng mẫu. Giữ bàn chải bên trong ống, trộn mạnh trên máy lắc xoay trong 1 phút +/- 10% để hòa tan H.pylori vào dung dịch Loại bỏ bàn chải và chèn pit-tông lọc, vào ống. Đẩy pit-tông nhẹ nhàng xuống vào ống để lấy không quá 150-200 ul của dịch nổi pha lỏng, thể tích đủ để tiến hành xét nghiệm.
5	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
6	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
7	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng.

Các bước	Nội dung
	Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
8	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Helicobacter pylori</i> Ag trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Helicobacter pylori</i> Ag bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
9	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Đổ giếng A1 trống làm giếng trắng. Cho 100 µl chất hiệu chuẩn 1 (2 giếng), 100 µl chất hiệu chuẩn 2 (2 giếng), 100 µl chất hiệu chuẩn 4 (1 giếng) và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định. Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng, trừ A1(mẫu trắng) Ủ 120 phút ở nhiệt độ 37°C Rửa phiến nhựa Cho 200 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng

Các bước	Nội dung
	Ủ phiên nhựa, không đậy nắp và tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng (18-24°C) trong 20 phút Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 20 phút sau khi dừng phản ứng
10	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
11	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tẩm ra sau khi chạy máy xong.
12	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
13	Tắt máy tính.
14	Tắt máy xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt yêu cầu

Điều kiện của phản ứng:

- Kiểm tra tính hợp lệ được thực hiện trên chất chứng/chất hiệu chuẩn bất cứ khi nào bộ xét nghiệm được sử dụng để xác minh OD450nm mong đợi hoặc giá trị S/CO đáp ứng trong phép phân tích.
- Đảm bảo:

Thông số	Yêu cầu
Giếng trắng	< 0.100 Giá trị OD450nm
Chất hiệu chuẩn 0 ug/ml	< 0.200 Giá trị trung bình OD450nm sau khi chạy mẫu trắng
Chất hiệu chuẩn 0.1 ug/ml	OD450nm > OD450nm Chất hiệu chuẩn 0 ug/ml + 0.100
Chất hiệu chuẩn 1 ug/ml	> 1.000 Giá trị OD450nm

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải kiểm tra và làm lại xét nghiệm.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Các kết quả xét nghiệm được tính toán bằng phương pháp giá trị ngưỡng được cài đặt trên máy tự động bằng cách: xác định từ giá trị OD450nm của chất hiệu chuẩn 0 µg/ml (CAL 0) và chất hiệu chuẩn 0.1 µg/ml (CAL 0.1) theo công thức sau:

$$\text{Giá trị ngưỡng} = (\text{CAL 0} + \text{CAL 0.1}) / 2$$

Đối với xét nghiệm định tính, kết quả xét nghiệm được giải thích dựa vào tỷ số của mẫu (S) và giá trị ngưỡng (CO), ký hiệu toán học là S/CO, như sau:

- + $S/CO \leq 1$: Âm tính.
- + $S/CO : 1 - 1,1$: Nghi ngờ → Cần xét nghiệm lần 2. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định.
- + $S/CO > 1,1$: Dương tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

111. *Campylobacter* Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện sự có mặt của kháng nguyên vi khuẩn *Campylobacter* trong mẫu bệnh phẩm huyết thanh/huyết tương người bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Nguyên lý:** Kháng nguyên vi khuẩn *Campylobacter* kết hợp với thuốc thử chứa kháng thể kháng *Campylobacter* được gắn với một số chất hóa học tạo thành hỗn hợp thuốc mang phức hợp miễn dịch. Hỗn hợp này được đưa vào ngăn đếm, tại đây chúng được kích thích phát sáng bằng điện áp. Sự có mặt của kháng nguyên vi khuẩn *Campylobacter* được đánh giá qua cường độ ánh sáng phát ra.
- **Định nghĩa**
 - + Calibrators: Mẫu chuẩn.
 - + Controls: Mẫu chứng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm

- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 – 90 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bước 1: chuẩn bị

- Kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy. Chuẩn bị các hóa chất kèm theo.
- Kiểm tra hiệu chuẩn máy
- Chạy các chứng chuẩn
- Ly tâm ống máu 3000 vòng/10 phút

Bước 2: chạy mẫu

Chạy mẫu không dùng barcode

- Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm.
- Hút huyết thanh/huyết tương vào cốc đựng mẫu tương ứng.
- Vào màn hình thao tác theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm.
- Chọn test CAMPYLO.
- Nhập số rack và vị trí mẫu.
- Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần xét nghiệm (hoặc cốc chứa mẫu bệnh phẩm) lên Rack đúng vị trí đã order và đưa vào khu nạp giá mẫu.
- Tiếp tục chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Chạy mẫu có dùng barcode

- Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Quản lý thông tin xét nghiệm.
- Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack quy định, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
- Tiếp tục chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

- Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Đọc kết quả và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể gặp khi:
- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Trang thiết bị không được vệ sinh hàng ngày, bảo trì, bảo dưỡng định kỳ.
- Xử trí:
- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất, có hiện tượng phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT).
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

112. Vi khuẩn Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể (Ab) kháng vi khuẩn trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i> Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm kháng thể kháng vi khuẩn cần tìm trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm kháng thể kháng vi khuẩn cần tìm bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK

Các bước	Nội dung
	Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng (đối với IgG: 1 bệnh phẩm +100 dilution buffer DILB) vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2 Ủ 60 phút (± 5 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) Rửa tám 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank. Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) Rửa tám 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) Nhỏ 100µl dung dịch dừng phản ứng STOP Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC.

4.2.2 Đọc kết quả:

Các kết quả xét nghiệm được tính toán được cài đặt trên máy tự động bằng cách:

Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

Kết quả:

+ Âm tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm $<$ Khoảng giá trị ngưỡng.

+ Dương tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm $>$ Khoảng giá trị ngưỡng.

Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Trong một số rất ít trường hợp bệnh lý miễn dịch kháng thể gammopathy đặc biệt typ IgM (Waldenstroms macroglobulinemia) có thể gây nên kết quả không xác thực.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

113. Vi nấm Ag miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên của vi nấm có trong mẫu huyết thanh, dịch rửa phế quản bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA. Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh, bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiết trùng
- Ống Falcon 5-15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml, 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: xử lý chứng âm, chứng dương, chứng ngưỡng cùng lúc với mẫu bệnh phẩm.
5	Hút 300 μ L mẫu huyết thanh/ dịch hút phết quần vào từng ống polypropylene 1,5 mL
6	Thêm 100 μ L dung dịch xử lý mẫu vào mỗi ống, lắc trộn kỹ.
7	Đun nóng mẫu ở 120°C trong 6 phút bằng máy gia nhiệt, hoặc 100°C trong 3 phút bằng bể đun nước.
8	Ly tâm 10.000 x g trong 10 phút.
9	Thu dịch nổi để làm xét nghiệm phát hiện Vi nấm Ag.
10	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
11	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Cho 100 μ l chất chứng và 100 μ l mẫu vào mỗi giếng đã định.
12	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
13	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
14	Nhỏ 100 μ l chất liên hợp vào mỗi giếng.
15	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
16	Lặp lại bước rửa.
17	Thêm 100 μ l cơ chất vào mỗi giếng.
18	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
19	Nhỏ 100 μ l Stop.
20	Đọc kết quả ở bước sóng 450 nm (bước sóng tham chiếu 650 nm)

4.2. Nhận định kết quả

Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

- Kết quả $>$ giá trị ngưỡng: Dương tính
- Kết quả $<$ giá trị ngưỡng: Âm tính
- Kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

114. *Aspergillus* Ag miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên *Aspergillus* có trong mẫu huyết thanh hoặc dịch rửa phế quản bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KN hoặc KT hoặc KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: *Aspergillus* Ag: *Aspergillus* Antigen (kháng nguyên *Aspergillus*).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ kit xét nghiệm kháng nguyên Platelia *Aspergillus* Ag (VD hoặc tương đương)
- Bộ kit xét nghiệm kháng nguyên *Aspergillus* Ag
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiết trùng
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đông 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Đồng hồ bấm giờ
- Máy rửa ELISA
- Máy đọc ELISA.
- Tủ ẩm
- Máy gia nhiệt 120°C hoặc bể đun ướn 100 °C
- Máy vortex

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu máu được lấy vào ống đông máu hoặc dịch rửa phế quản đựng trong ống vô khuẩn.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Xử lý chứng âm, chứng dương, chứng ngưỡng cùng lúc với mẫu bệnh phẩm.
- Hút 300 μ L mẫu huyết thanh/ dịch hút phết ủ vào từng ống polypropylene 1,5 mL
- Thêm 100 μ L dung dịch xử lý mẫu vào mỗi ống, lắc trộn kĩ.
- Đun nóng mẫu ở 120 °C trong 6 phút bằng máy gia nhiệt, hoặc 100oC trong 3 phút bằng bể đun nước.
- Ly tâm 10.000 x g trong 10 phút.
- Thu dịch nổi để làm xét nghiệm phát hiện *Aspergillus* Ag.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25 °C), đảo đều hóa chất.
- Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn.
- Chuẩn bị sơ đồ nhỏ mẫu.
- Nhỏ 50 μ l Conjugate vào mỗi giếng.
- Nhỏ 50 μ l chứng dương, chứng âm, chứng ngưỡng và mẫu đã xử lý vào các giếng.
- Che kín tấm đã nhỏ để tránh bay hơi, ủ trong 90 phút ($\pm$ 5 phút) ở 37 °C ($\pm$ 1 °C).
- Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
- Thêm 200 μ l TMB vào mỗi giếng, tránh ánh sáng mạnh.
- Ủ trong bóng tối, trong 30 phút ($\pm$ 5 phút) ở nhiệt độ phòng (18-25 °C).
- Nhỏ 100 μ l Stop Solution.
- Đọc kết quả ở bước sóng 450 nm (bộ lọc tham chiếu 620/630 nm)

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

- Cài đặt bước sóng máy đọc 450nm/620nm-650nm.

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
- Kết quả âm tính: Không phát hiện *Aspergillus* Ag trong mẫu bệnh phẩm, hoặc *Aspergillus* Ag trong mẫu ở dưới ngưỡng phát hiện.
- Kết quả dương tính: Phát hiện *Aspergillus* Ag trong mẫu bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

115. *Aspergillus galactomannan* định lượng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên *Aspergillus galactomannan* có trong mẫu huyết thanh hoặc dịch rửa phế quản bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym)..

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ kit xét nghiệm kháng nguyên *Aspergillus Galatomannan* (VD hoặc tương đương)
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml

- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2 oC - 8oC
- Tủ lạnh âm sâu -20oC
- Tủ lạnh âm sâu -70oC
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Đồng hồ bấm giờ
- Máy rửa ELISA
- Máy đọc ELISA.
- Tủ ấm
- Máy gia nhiệt 120oC hoặc bể đun ướn 100oC
- Máy vortex

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Xử lý chứng âm, chứng dương, chứng ngưỡng cùng lúc với mẫu bệnh phẩm.
- Hút 300 μ L mẫu huyết thanh/ dịch hút phết quản vào từng ống polypropylene 1,5 mL
- Thêm 100 μ L dung dịch xử lý mẫu vào mỗi ống, lắc trộn kĩ.
- Đun nóng mẫu ở 120°C trong 6 phút bằng máy gia nhiệt, hoặc 100°C trong 3 phút bằng bể đun nước.
- Ly tâm 10.000 x g trong 10 phút.
- Thu dịch nổi để làm xét nghiệm phát hiện galactomannan.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
- Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn.
- Chuẩn bị sơ đồ nhỏ mẫu.
- Nhỏ 50 μ L Conjugate vào mỗi giếng.
- Nhỏ 50 μ L chứng dương, chứng âm, chứng ngưỡng và mẫu đã xử lý vào các giếng.
- Che kín tấm đã nhỏ để tránh bay hơi, ủ trong 90 phút ($\pm$ 5 phút) ở 37°C ($\pm$ 1°C).
- Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
- Thêm 200 μ L TMB vào mỗi giếng, tránh ánh sáng mạnh.
- Ủ trong bóng tối, trong 30 phút ($\pm$ 5 phút) ở nhiệt độ phòng (18-25°C).
- Nhỏ 100 μ L Stop Solution.
- Đọc kết quả ở bước sóng 450 nm (bộ lọc tham chiếu 620/630 nm).
- Đưa kết quả đã đọc lên phần mềm tính toán đã cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

- Cài đặt bước sóng máy đọc 450nm/620nm-650nm.

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Không phát hiện galactomannan trong mẫu bệnh phẩm, hoặc galactomannan trong mẫu ở dưới ngưỡng phát hiện
- Kết quả dương tính: Phát hiện galactomannan trong mẫu bệnh phẩm.
- Kết quả định lượng: tính toán theo công thức hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- + Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- + Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- + Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- + Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

116. Vi nấm Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể kháng với vi nấm có trong các mẫu bệnh phẩm huyết thanh của người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA: Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán Vi nấm Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 200 μ L tiết trùng
- Đầu côn 10 μ L tiết trùng
- Tuýp 5-15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.4. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.5. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định.
7	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
8	Rửa tay hoặc rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Nhỏ 100 µl chất liên hợp vào mỗi giếng.
10	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
11	Lặp lại bước rửa.
12	Thêm 100 µl cơ chất vào mỗi giếng.
13	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
14	Nhỏ 100 µl Stop.
15	Đọc kết quả ở bước sóng 405 nm (bước sóng tham chiếu 650 nm)

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

- Kết quả $>$ giá trị ngưỡng: Dương tính
- Kết quả $<$ giá trị ngưỡng: Âm tính

Kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

117. *Aspergillus* Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể kháng *Aspergillus* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ kit xét nghiệm kháng thể *Aspergillus* Ab (VD hoặc tương đương)
- Bộ kit xét nghiệm kháng thể *Aspergillus* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiết trùng
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Lọ đựng bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Đồng hồ bấm giờ
- Máy rửa ELISA
- Máy đọc ELISA.
- Tủ ẩm
- Máy gia nhiệt 120°C hoặc bể đun 100 °C
- Máy vortex

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Tách huyết thanh từ mẫu máu để làm xét nghiệm

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
- Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn.
- Chuẩn bị sơ đồ nhỏ mẫu.
- Pha loãng mẫu huyết thanh theo tỷ lệ hướng dẫn.
- Nhỏ 100 µl chứng, chuẩn, mẫu đã pha loãng vào mỗi giếng.
- Ủ trong 60 phút ở 37°C.
- Rửa tay hoặc dung rửa máy với dung dịch rửa đã pha 4 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
- Nhỏ 100 µl chất liên hợp APC vào mỗi giếng.
- Ủ trong 30 phút ở 37°C.
- Lặp lại bước rửa.
- Thêm 100 µl pNPP vào mỗi giếng.
- Ủ trong 30 phút ở 37°C.
- Nhỏ 100 µl Stop.
- Đọc kết quả ở bước sóng 405 nm (bước sóng tham chiếu 650 nm)

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm:

Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

- Cài đặt bước sóng máy đọc 405nm/620nm-650nm.
- Đọc kết quả theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
- Kết quả âm tính: Không phát hiện kháng thể kháng *Aspergillus* trong mẫu bệnh phẩm, hoặc nồng độ kháng thể trong mẫu ở dưới ngưỡng phát hiện
- Kết quả dương tính: Phát hiện kháng thể kháng *Aspergillus* trong mẫu bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

118. *Aspergillus fumigatus* IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng *Aspergillus fumigatus* có trong mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Aspergillus fumigatus* IgG
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 200 μ L tiết trùng
- Đầu côn 10 μ L tiết trùng
- Tuýp 15 ml
- Lọ đựng bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Đồng hồ bấm giờ
- Máy rửa ELISA
- Máy đọc ELISA.
- Tủ âm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định.
7	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
8	Rửa tay hoặc rửa máy với dung dịch rửa đã pha 4 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Nhỏ 100 µl chất liên hợp vào mỗi giếng.
10	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
11	Lặp lại bước rửa.
12	Thêm 100 µl cơ chất vào mỗi giếng.
13	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
14	Nhỏ 100 µl Stop.
15	Đọc kết quả ở bước sóng 405 nm (bước sóng tham chiếu 650 nm)

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Không phát hiện kháng thể IgG kháng *Aspergillus fumigatus* trong mẫu bệnh phẩm, hoặc nồng độ kháng thể trong mẫu ở dưới ngưỡng phát hiện

- Kết quả dương tính: Phát hiện kháng thể IgG kháng *Aspergillus fumigatus* trong mẫu bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn.
- Thời gian ủ, nhiệt độ ủ không chính xác.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

119. *Aspergillus fumigatus* IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng *Aspergillus fumigatus* có trong mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Aspergillus fumigatus* IgM ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Aspergillus fumigatus* IgM
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 200 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 10 μ L tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml

- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Đồng hồ bấm giờ
- Máy rửa ELISA
- Máy đọc ELISA.
- Tủ ẩm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Aspergillus fumigatus* IgM ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định.
7	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
8	Rửa tay hoặc rửa máy với dung dịch rửa đã pha 4 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Nhỏ 100 µl chất liên hợp vào mỗi giếng.
10	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
11	Lặp lại bước rửa.
12	Thêm 100 µl cơ chất vào mỗi giếng.
13	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
14	Nhỏ 100 µl Stop.
15	Đọc kết quả ở bước sóng 405 nm (bước sóng tham chiếu 650 nm) (theo hướng dẫn nhà sản xuất)

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Không phát hiện kháng thể IgM kháng *Aspergillus fumigatus* trong mẫu bệnh phẩm, hoặc nồng độ kháng thể trong mẫu ở dưới ngưỡng phát hiện
- Kết quả dương tính: Phát hiện kháng thể IgM kháng *Aspergillus fumigatus* trong mẫu bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn.
- Thời gian ủ, nhiệt độ ủ không chính xác.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

120. Vi nấm Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên của vi nấm có trong mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Nguyên lý của kỹ thuật ELISA: Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.
- Định nghĩa:
 - + Calibrators: Mẫu chuẩn.
 - + Controls: Mẫu chứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán Vi nấm Ag
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiệt trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml

- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Để số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: xử lý chứng âm, chứng dương, chứng ngưỡng cùng lúc với mẫu bệnh phẩm.
5	Hút 300 μ L mẫu huyết thanh/ dịch hút phết quần vào từng ống polypropylene 1,5 mL
6	Thêm 100 μ L dung dịch xử lý mẫu vào mỗi ống, lắc trộn kỹ.
7	Đun nóng mẫu ở 120°C trong 6 phút bằng máy gia nhiệt, hoặc 100°C trong 3 phút bằng bể đun nước.
8	Ly tâm 10.000 x g trong 10 phút.
9	Thu dịch nổi để làm xét nghiệm phát hiện Vi nấm Ag.
10	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
11	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu.
12	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
13	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
14	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước

Các bước	Nội dung
	+ Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
15	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm kháng nguyên vi nấm cần tìm trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm kháng nguyên vi nấm cần tìm bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
16	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình. Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm Rửa 5 lần Cho 100 µl chất liên hợp vào mỗi giếng Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm Rửa 5 lần Cho 100 µl cơ chất vào mỗi giếng Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng Đọc kết quả ở bước sóng 450 nm (bước sóng tham chiếu 650 nm)
17	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.

Các bước	Nội dung
18	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắt ra sau khi chạy máy xong.
19	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
20	Tắt máy tính.
21	Tắt máy xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

- Kết quả $>$ giá trị ngưỡng: Dương tính
- Kết quả $<$ giá trị ngưỡng: Âm tính
- Kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Trong một số rất ít trường hợp bệnh lý miễn dịch kháng thể gammopathy đặc biệt typ IgM (Waldenstroms macroglobulinemia) có thể gây nên kết quả không xác thực.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

121. *Aspergillus* Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên *Aspergillus* Ag có trong mẫu huyết thanh hoặc dịch rửa phế quản bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: *Aspergillus* Ag (*Aspergillus* Antigen): kháng nguyên *Aspergillus*

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Aspergillus* Ag (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng

- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Máy gia nhiệt 120°C hoặc bể đun 100 °C
- Máy siêu ly tâm 10000g
- Máy vortex
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc dịch phết quản
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Aspergillus* Ag (Ví dụ hoặc tương đương) chạy trên hệ thống ELISA tự động.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: xử lý chứng âm, chứng dương, chứng ngưỡng cùng lúc với mẫu bệnh phẩm.
5	Hút 300 μ L mẫu huyết thanh/ dịch hút phế quản vào từng ống polypropylene 1,5 mL
6	Thêm 100 μ L dung dịch xử lý mẫu vào mỗi ống, lắc trộn kỹ.
7	Đun nóng mẫu ở 120°C trong 6 phút bằng máy gia nhiệt, hoặc 100°C trong 3 phút bằng bể đun nước.
8	Ly tâm 10.000 x g trong 10 phút.
9	Thu dịch nổi để làm xét nghiệm phát hiện <i>Aspergillus</i> Ag.
10	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
11	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Cho 100 μ l chất chứng và 100 μ l mẫu vào mỗi giếng đã định.
12	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
13	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
14	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy:

Các bước	Nội dung
	+ Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
15	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Aspergillus</i> Ag trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Aspergillus</i> Ag bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
16	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình.
17	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
18	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
19	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
20	Tắt máy tính.

Các bước	Nội dung
21	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả dương tính: Trong mẫu bệnh phẩm có kháng nguyên *Aspergillus* Ag
- Kết quả âm tính: Không phát hiện kháng nguyên *Aspergillus* Ag trong mẫu bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

122. Vi nấm Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với vi nấm có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, Nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán Vi nấm Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu.
7	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
8	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
9	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
10	Nhập thông tin bệnh nhân:

Các bước	Nội dung
	Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Vi nấm Ab trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Vi nấm Ab bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
11	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình. Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm Rửa 5 lần Cho 100 µl chất liên hợp vào mỗi giếng Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm Rửa 5 lần Cho 100 µl cơ chất vào mỗi giếng Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng Đọc kết quả ở bước sóng 405 nm (bước sóng tham chiếu 650 nm)
12	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
13	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.

Các bước	Nội dung
14	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
15	Tắt máy tính.
16	Tắt máy xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC. Chỉ trả kết quả khi chứng dương và chứng âm đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm vi nấm hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm vi nấm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Trong một số rất ít trường hợp bệnh lý miễn dịch kháng thể gammopathy đặc biệt typ IgM (Waldenstroms macroglobulinemia) có thể gây nên kết quả không xác thực.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

123. Vi khuẩn kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm và nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh với chủng vi khuẩn gây bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý:

- Dải giấy khuếch tán: Dải giấy kháng sinh có kích thước 5 x 57 mm, được phân bố dải MIC theo $\mu\text{g/mL}$ và có mã code tên kháng sinh. Có 15 nồng độ kháng sinh được pha loãng bậc 2 gắn cố định ở một mặt của dải giấy. Khi dải giấy được đặt lên mặt thạch đã dàn vi khuẩn, kháng sinh ở có bậc nồng độ nhanh chóng khuếch tán trong thạch. Sau khi nuôi cấy qua đêm, sẽ xuất hiện vùng ức chế hình elip đối xứng qua dải giấy. Giá trị MIC được xác định trực tiếp tại điểm cắt của hình elip với dải giấy. Giá trị MIC sẽ được phiên giải ra phân loại S (sensitive – nhạy cảm), I (intermediate – trung gian), hoặc R (resistant – đề kháng) khi so sánh với bảng chuẩn CLSI cập nhật hàng năm.
- Vi pha loãng sử dụng MIC-strip kháng sinh: Kháng sinh với dải nồng độ pha loãng bậc 2 được chuẩn bị sẵn trong các giếng dưới dạng đông khô. Bổ sung huyền dịch vi khuẩn cần thử nghiệm vào các giếng đã có kháng sinh đông khô với các bậc nồng độ sẵn có. Giá trị MIC kháng sinh được xác định ở giếng có nồng độ kháng sinh pha loãng nhất ức chế được sự phát triển của vi khuẩn khi quan sát bằng mắt thường.

Định nghĩa:

S (Susceptibility) - Nhạy cảm: Một vi khuẩn được coi là nhạy cảm với một kháng sinh nào đó có nghĩa là khi nhiễm trùng do vi khuẩn này gây ra sẽ đáp ứng với phác đồ điều trị bằng kháng sinh thử nghiệm với liều lượng được khuyến cáo.

I (Intermediate) - Trung gian:

- Khi áp dụng cho một chủng vi khuẩn coi là đề kháng trung gian với một kháng sinh nào đó có nghĩa là nhiễm trùng do vi khuẩn này có thể đáp ứng với phác đồ điều trị kháng sinh nhưng với liều lượng cao hơn liều khuyến cáo để kháng sinh có thể tập trung nhiều hơn đến ổ nhiễm trùng.
- Khi áp dụng cho một chủng vi khuẩn coi là đề kháng trung gian với một kháng sinh nào đó có nghĩa là nhiễm trùng do vi khuẩn này có thể đáp ứng với phác đồ điều trị kháng sinh với liều lượng khuyến cáo nhưng với điều kiện kháng sinh có đặc tính tập trung nhiều hơn ở ổ nhiễm trùng.

R (Resistant) - Đề kháng: Một vi khuẩn được coi là đề kháng với một kháng sinh nào đó có nghĩa là khi nhiễm trùng do vi khuẩn này gây ra sẽ không đáp ứng với phác đồ điều trị bằng kháng sinh thử nghiệm với liều lượng được khuyến cáo.

MIC (Minimum inhibitory concentration): Nồng độ ức chế tối thiểu là nồng độ kháng sinh pha loãng nhất còn ức chế được sự phát triển của vi khuẩn.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Thạch Muller Hinton hoặc thạch kháng sinh đồ phù hợp
- Thạch máu
- Canh thang kháng sinh đồ
- Dải giấy kháng sinh
- MIC-strip
- Nước muối sinh lý
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*
- Que gỗ
- Que tăm bông
- Giấy lau bề mặt
- Panh
- Đầu côn
- Giá đựng ống nghiệm
- Khung đỡ strip và nắp đậy
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Đèn cồn
- Chủng chuẩn
- Ống nghiệm thủy tinh
- Micropipette
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chúng vi khuẩn được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần và mới.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm: sau khi có chỉ định 24 - 48 giờ (1 – 2 ngày) có thể kéo dài hơn với các vi khuẩn mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 16-24 giờ).

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

4.1.2.1. Tiến hành theo phương pháp dải giấy khuếch tán

- Pha huyền dịch vi khuẩn: Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ 3-5 khuẩn lạc có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống nước muối sinh lý 5 ml, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất có độ đục tương ứng với độ đục của ống McFarland 0,5.
- Dàn đều canh khuẩn lên mặt đĩa thạch: Dùng tăm bông vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn tăm bông trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt phần huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông. Sau đó, ria đều que tăm bông trên toàn bộ mặt đĩa thạch Mueller-Hinton sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt đĩa thạch
- Đặt dải giấy kháng sinh lên mặt thạch để đảm bảo chúng được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Khi đã đặt xong dải giấy kháng sinh, không được dịch chuyển dải giấy khỏi vị trí. Trong vòng 15 phút sau khi pha huyền dịch vi khuẩn, các đĩa thạch phải được lật úp để trong tủ ấm 35°C.
- Một lượng nhỏ huyền dịch được ria lên đĩa cấy thuần.
- Ủ đĩa thạch trong tủ ấm 16 - 24 giờ.

4.1.2.2. Tiến hành theo phương pháp vi pha loãng sử dụng MIC-strip

- Pha huyền dịch vi khuẩn: Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ 3-5 khuẩn lạc có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống nước muối sinh lý 5 ml, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất có độ đục tương ứng với độ đục của ống McFarland 0,5.
- Chuyển 1 thể tích huyền dịch vi khuẩn đã pha sang ống chứa canh thang kháng sinh đồ đã bổ sung chất chỉ thị theo hướng dẫn của nhà sản xuất và chuyển 1 lượng huyền dịch nhỏ sang đĩa thạch cấy thuần.
- Chuyển huyền dịch trong ống canh thang kháng sinh đồ sau khi lắc đều vào các giếng của strip theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Ủ strip và đĩa cấy thuần ở 35 – 37°C trong 16 – 24 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC, đĩa thuần đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Dải giấy khuếch tán: Sau ủ ấm 16 – 24 h và khi thấy rõ vi khuẩn mọc, đọc giá trị MIC ở điểm cắt của hình elip với thanh E-test. Làm tròn giá trị MIC ở điểm giữa hai bậc pha loãng lên giá trị cao hơn một bậc trước khi phiên giải kết quả.
- MIC strip: đọc giá trị MIC ở giếng có nồng độ kháng sinh thấp nhất còn trong. Nếu có 1 giếng skip, bỏ qua giếng đó và đọc giá trị MIC ở giếng phía sau không thấy vi khuẩn mọc. Nếu có từ 2 giếng skip trở lên, cần làm lại.
- Phiên giải kết quả MIC ra giá trị S, I hoặc R theo tài liệu của CLSI cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do thanh giấy kháng sinh và môi trường thực hiện không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.

Sai sót có thể gặp khi:

- Lẫn hai hay nhiều chủng vi khuẩn
- Huyền dịch vi khuẩn pha không đảm bảo đúng tiêu chuẩn (quá loãng hoặc quá đặc) hoặc để quá lâu mới làm các bước tiếp theo.

Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

124. *Neisseria gonorrhoeae* kháng thuốc định lượng (MIC)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm và nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration- MIC) của một số kháng sinh đối với vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là nồng độ kháng sinh nhỏ nhất mà tại đó ức chế được sự phát triển của vi khuẩn. E-test là dải giấy hoặc dải plastic được phân bố kháng sinh theo dải nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) giảm dần. Khi dải Etest được đặt lên mặt thạch đã dàn vi khuẩn, kháng sinh ở các bậc nồng độ nhanh chóng khuếch tán trong thạch. Sau khi nuôi cấy qua đêm, sẽ xuất hiện vùng ức chế hình elip đối xứng qua thanh E-test. Giá trị MIC được xác định trực tiếp tại điểm cắt của hình elip với dải E-test.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Thanh kháng sinh (Etest)
- Khoanh giấy kháng sinh
- Môi trường phân lập vi khuẩn cho *N.gonorrhoeae*
- Môi trường làm kháng sinh đồ cho *N.gonorrhoeae*
- Môi trường lưu giữ chủng
- Môi trường cấy chuyển chủng
- Độ đục chuẩn McFarland 0,5
- Nước muối sinh lý
- Cồn 70%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Que cấy
- Tăm bông vô trùng
- Ống thủy tinh vô trùng
- Giấy lau bề mặt

- Pipet Pasteur
- Giá đựng ống nghiệm
- Kẹp để phân phối khoanh giấy kháng sinh
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Bật lửa
- Chũm chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Tủ ấm 35°C - 37°C, 5% CO₂
- Máy đo độ đục
- Máy Vortex
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Chủng *Neisseria gonorrhoeae* phân lập từ mẫu bệnh nhân được nuôi cấy trên môi chọn lọc
- Yêu cầu:
 - + Các khuẩn lạc *Neisseria gonorrhoeae* phải thuần nhất và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (sau 20-24 giờ nuôi cấy trong điều kiện tối ưu).

+ Chủng *Neisseria gonorrhoeae* lưu trữ từ ống giữ chủng cần được cấy chuyển trên môi trường phù hợp ít nhất hai lần.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 24 giờ.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

a. Chuẩn bị môi trường, thanh kháng sinh

- Để đĩa môi trường làm KSD, thanh kháng sinh về nhiệt độ phòng
- Lựa chọn các thanh kháng sinh Etest theo khuyến cáo của CLSI cập nhật hàng năm.

b. Pha huyền dịch vi khuẩn

- Dùng que cấy lấy 3-5 khuẩn lạc vi khuẩn có hình thái giống nhau từ đĩa thạch nuôi cấy thuần và nghiền đều vào ống nước muối sinh lý 5 mL, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất. Đo độ đục của huyền dịch vi khuẩn để đạt $0,5 \pm 0,05$ McFarland. Có thể điều chỉnh thêm vi khuẩn hoặc thêm nước muối vào ống canh khuẩn sao cho ống canh khuẩn đạt được độ đục theo yêu cầu trên. Huyền dịch vi khuẩn sau khi pha, phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút.

c. Trải huyền dịch vi khuẩn trên mặt thạch

- Dùng que tăm bông vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn que tăm bông trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông. Sau đó ria đều que tăm bông trên toàn bộ mặt đĩa thạch theo góc 60° rồi ria đều que tăm bông. Cứ tiếp tục xoay đĩa một góc 60° và ria que tăm bông để sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt thạch. Cuối cùng, ria tăm bông (que gòn) vòng quanh bờ mép của mặt thạch.
- Đóng nắp đĩa thạch và để đĩa thạch sau ria cấy vài phút ở nhiệt độ phòng cho mặt thạch se lại hoàn toàn trước khi đặt kháng sinh.

d. Đặt thanh kháng sinh Etest

- Dùng kẹp lấy thanh E-test đặt lên trên mặt thạch đã ria vi khuẩn sao cho mặt có ghi tên kháng sinh và nồng độ kháng sinh phải hướng lên trên
- Đảm bảo toàn bộ bề mặt thanh E-test tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch và không di chuyển vị trí thanh E-test sau khi đã đặt xong.
- Đặt tối đa 6 thanh E-test đối với đĩa thạch đường kính 150 mm và 2 thanh E-test đối với đường kính 90mm.
- Trong vòng 15 phút sau khi đã đặt thanh E-test, khoanh giấy kháng sinh cho các đĩa thạch vào trong tủ ẩm 35°C - 37°C, 5% CO₂. Ủ đĩa thạch trong 20-24 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả kháng sinh đồ chủng người bệnh khi kết quả QC đạt.

4.2.2. Đọc kết quả

- Đọc giá trị MIC ở điểm cắt của hình Elip với thanh E-test. Không đọc kết quả khi đĩa thạch mọc lẫn hai hay nhiều loại vi khuẩn, khi vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.
- Làm tròn giá trị MIC ở điểm giữa hai bậc pha loãng lên giá trị cao hơn trước khi làm phiên giải kết quả.

4.2.3. Phiên giải kết quả

- Phiên giải kết quả ra S, I, R theo hướng dẫn của CLSI cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Chủng vi khuẩn không thuần nhất hoặc chủng quá già hay quá non đều ảnh hưởng đến đường kính vùng ức chế. Cần ria lại chủng cho thuần nhất và ủ ở điều kiện tối ưu trong thời gian 20-24 giờ.
- Bảo quản khoanh giấy kháng sinh đúng theo quy định của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Đĩa kháng sinh đồ mọc hai hay nhiều loại vi khuẩn: kiểm tra lại độ thuần nhất của chủng, đĩa môi trường làm kháng sinh đồ, nước muối sinh lý, các vật tư vô trùng trong quá trình thực hiện kỹ thuật có đảm bảo vô trùng không. Thực hiện lại thử nghiệm, chú ý tuân thủ thao tác vô trùng.

- Vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá mỏng: thực hiện lại thử nghiệm, chú ý đo đúng độ đục huyền dịch, đảm bảo chủng được nuôi cấy đủ thời gian và trong điều kiện tối ưu, lấy đủ lượng huyền dịch trải đều lên mặt thạch.
- Khoanh giấy kháng sinh bị rơi ra khỏi bề mặt thạch: do bề mặt thạch quá ướt nên khoanh kháng sinh bị trôi hoặc khi đặt không ấn khoanh kháng sinh xuống mặt thạch. Thực hiện lại thử nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

125. Vi nấm kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm và nồng độ ức chế tối thiểu của thuốc kháng nấm với chủng vi nấm gây bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý:

Dải giấy khuếch tán: Dải giấy kháng nấm có kích thước 5 x 57 mm, được phân bố dải MIC theo µg/mL và có mã code tên thuốc kháng nấm. Có 15 nồng độ thuốc kháng nấm được pha loãng bậc 2 gắn cố định ở một mặt của dải giấy. Khi dải giấy được đặt lên mặt thạch đã dàn vi nấm, thuốc kháng nấm ở có bậc nồng độ nhanh chóng khuếch tán trong thạch. Sau khi nuôi cấy đủ thời gian, sẽ xuất hiện vùng ức chế hình elip đối xứng qua dải giấy. Giá trị MIC được xác định trực tiếp tại điểm cắt của hình elip với dải giấy. Giá trị MIC sẽ được phiên giải ra phân loại S (sensitive – nhạy cảm), I (intermediate – trung gian), hoặc R (resistant – đề kháng) khi so sánh với bảng chuẩn CLSI cập nhật hàng năm.

Vi pha loãng sử dụng MIC strip/plate: Thuốc kháng nấm với dải nồng độ pha loãng bậc 2 được chuẩn bị sẵn trong các giếng dưới dạng đông khô. Bổ sung huyền dịch vi nấm cần thử nghiệm vào các giếng đã có thuốc kháng nấm với các nồng độ sẵn có. Giá trị MIC thuốc kháng nấm được xác định ở giếng có nồng độ thuốc kháng nấm pha loãng nhất ức chế được sự phát triển của vi nấm khi quan sát bằng mắt thường.

Thử nghiệm nhạy cảm với thuốc kháng nấm bằng Sensititre yeast là thử nghiệm vi pha loãng tạo màu. Mỗi plate có chứa các thuốc kháng nấm ở nồng độ pha loãng nhất định và chất chỉ thị màu. Kết quả MIC được đọc bằng mắt thường khi quan sát nồng độ kháng nấm thấp nhất ức chế được sự phát triển của nấm (giếng không có sự thay đổi màu) và được phân chia thành các mức độ S (susceptibility – nhạy cảm), I (intermediate – trung gian), hoặc R (resistant – đề kháng) hoặc phân loại WT (wild type) và non-WT (non-wild type) khi so sánh với bảng chuẩn phiên giải kết quả do nhà sản xuất cung cấp.

Định nghĩa:

S (Susceptibility) - Nhạy cảm: Một vi nấm được coi là nhạy cảm với một thuốc kháng nấm nào đó có nghĩa là khi nhiễm trùng do vi nấm này gây ra sẽ đáp ứng với phác đồ điều trị bằng thuốc kháng nấm thử nghiệm với liều lượng được khuyến cáo.

I (Intermediate) - Trung gian:

- Khi áp dụng cho một chủng vi nấm coi là đề kháng trung gian với một thuốc kháng nấm nào đó có nghĩa là nhiễm trùng do vi nấm này có thể đáp ứng với phác đồ điều trị thuốc kháng nấm nhưng với liều lượng cao hơn liều khuyến cáo để thuốc kháng nấm có thể tập trung nhiều hơn đến ổ nhiễm trùng.

- Khi áp dụng cho một chủng vi nấm coi là đề kháng trung gian với một thuốc kháng nấm nào đó có nghĩa là nhiễm trùng do vi nấm này gây ra sẽ không đáp ứng với phác đồ điều trị thuốc kháng nấm với liều lượng khuyến cáo nhưng với điều kiện thuốc kháng nấm có đặc tính tập trung nhiều hơn ở ổ nhiễm trùng.

R (Resistant) - Đề kháng: Một vi nấm được coi là đề kháng với một thuốc kháng nấm nào đó có nghĩa là khi nhiễm trùng do vi nấm này gây ra sẽ không đáp ứng với phác đồ điều trị bằng thuốc kháng nấm thử nghiệm với liều lượng được khuyến cáo.

MIC (Minimum inhibitory concentration): Nồng độ ức chế tối thiểu là nồng độ thuốc kháng nấm pha loãng nhất còn ức chế được sự phát triển của vi nấm.

WT (Wild type): Chủng hoang dại là chủng vi nấm không có các cơ chế đề kháng thu được.

Non-WT (Non-wild type): Biến chủng là các chủng vi nấm có các mang các cơ chế đề kháng thu được.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Thạch RPMI
- Dung dịch pha huyền dịch vi nấm
- Canh thang kháng nấm đồ
- Plate thuốc kháng nấm/dải giấy thuốc kháng nấm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*
- Que gỗ
- Que tăm bông
- Giấy lau bề mặt
- Đầu côn
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Đèn cồn

- Chủng chuẩn
- Ống nghiệm thuỷ tinh
- Micropipette
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ ấm 35°C, khí trường thường
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Pipette đơn kênh, đa kênh

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chủng vi nấm được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần và mới.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm: sau khi có chỉ định 48 – 120 giờ (2 – 5 ngày) có thể kéo dài hơn với các vi nấm mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Chủng vi nấm cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

4.1.2.1. Tiến hành theo phương pháp dải giấy khuếch tán

- Pha huyền dịch vi nấm: Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ 3-5 khuẩn lạc có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống 5 ml nước pha thích hợp cho từng loài nấm, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất có độ đục tương ứng với độ đục của ống McFarland 0,5.
- Dàn đều huyền dịch vi nấm lên mặt đĩa thạch: Dùng tăm bông vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi nấm đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn tăm bông trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt phần huyền dịch vi nấm đã thấm vào đầu tăm bông. Sau đó, ria đều que tăm bông trên toàn bộ mặt đĩa thạch RPMI sao cho vi nấm được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt đĩa thạch.
- Đặt dải giấy thuốc kháng nấm lên mặt thạch để đảm bảo chúng được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Khi đã đặt xong dải giấy thuốc kháng nấm, không được dịch chuyển dải giấy khỏi vị trí. Trong vòng 15 phút sau khi pha huyền dịch vi nấm, các đĩa thạch phải được lật úp để trong tủ ẩm điều kiện nhiệt độ thích hợp.
- Một lượng nhỏ huyền dịch được ria lên đĩa cấy thuần.
- Ủ đĩa thạch trong tủ ẩm thời gian tùy thuộc từng loài nấm.

4.1.2.2. Tiến hành theo phương pháp vi pha loãng sử dụng MIC-strip

- Pha huyền dịch vi nấm: Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ 3-5 khuẩn lạc có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống 5 ml nước pha thích hợp cho từng loài nấm, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất có độ đục tương ứng với độ đục của ống McFarland 0,5.
- Chuyển 1 thể tích huyền dịch vi nấm đã pha sang ống chứa canh thang kháng nấm theo hướng dẫn của nhà sản xuất và chuyển 1 lượng huyền dịch nhỏ sang đĩa thạch cấy đếm.
- Chuyển huyền dịch trong ống canh thang kháng nấm đồ sau khi lắc đều vào các giếng của strip/plate theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Ủ strip/plate và đĩa cấy đếm ở 35°C trong thời gian phù hợp với từng loài nấm.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC và đĩa cấy đếm đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Trong các giếng có vi nấm mọc, sẽ có sự thay đổi màu từ xanh (không mọc) sang đỏ (có mọc). Một số nấm có thể không làm thay đổi màu hoàn toàn sang đỏ mà sẽ có màu tím. Một số chủng nấm chỉ làm đổi màu sang tím nhạt với các thuốc nhóm azole.
- Đọc giếng chứng trước khi đọc kết quả. Nếu giếng chứng vẫn có màu xanh hay tím nhạt thì ủ tiếp plate thêm 24h. Không bao giờ đọc độ đục mà chỉ dựa vào sự thay đổi màu sắc để đọc kết quả.
- Giá trị MIC là nồng độ thuốc kháng nấm thấp nhất ức chế được vi nấm tại giếng còn có thể phát hiện được sự đổi màu (giếng có màu xanh đầu tiên). Sự thay đổi màu cần được so sánh với giếng chứng. Lưu ý đọc MIC của AB sau 24 h ở giếng đầu tiên không có bất kỳ sự đổi màu nào. MIC của FC và azoles đọc ở giếng đầu tiên có sự giảm màu so so với chứng. MIC của Echinocandin nên đọc sau 24 và đọc ở giếng đầu tiên có sự giảm màu so so với chứng.
- Với Aspergillus, đọc giá trị MIC ở nồng độ thấp nhất ở giếng có màu xanh.
- Kết quả được phiên giải ra phân loại là nhạy cảm (S), trung gian (I) hay đề kháng (R) hoặc phân loại WT (wild type) và non-WT (non-wild type) CLSI hoặc EUCAST.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do plate thuốc kháng nấm không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Chủng vi nấm lẫn
- Huyền dịch vi nấm pha không đảm bảo đúng tiêu chuẩn (quá loãng hoặc quá đặc) hoặc để quá lâu mới làm các bước tiếp theo.

Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

126. Vi khuẩn kháng sinh phối hợp

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Tìm cặp kháng sinh phối hợp có tác dụng hiệp đồng trên chủng vi khuẩn gây bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định tác dụng hiệp đồng, đối kháng hoặc không khác biệt (giá trị MIC) khi thử nghiệm phối hợp 2 kháng sinh khác nhau với vi khuẩn gây bệnh bằng dải giấy dựa trên chỉ số FIC (Fractional Inhibitory Concentration).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Thạch Muller-Hinton
- Thạch máu
- Dải giấy kháng sinh
- Nước muối sinh lý
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*
- Que gỗ
- Que tăm bông
- Giấy lau bề mặt
- Panh
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Đèn cồn
- Chủng chuẩn
- Ống nghiệm thủy tinh

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chúng vi khuẩn được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần và mới.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm: sau khi có chỉ định 72 – 96 giờ (3 – 4 ngày) có thể kéo dài hơn với các vi khuẩn mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 16-24 giờ).

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất được ví dụ ở trên.

a. Xác định MIC của từng loại kháng sinh với chủng vi khuẩn

- Pha huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương ứng với độ đục McFarland 0.5
- Dàn đều canh khuẩn lên mặt 2 đĩa thạch Mueller-Hinton và cấy thuần trên 1 đĩa thạch máu
- Đặt 2 dải kháng sinh lên 2 đĩa thạch đã dàn đều vi khuẩn
- Ủ các đĩa thạch trong tủ ấm 16 - 18 giờ
- Đọc kết quả giá trị MIC của cả hai kháng sinh

b. Xác định MIC khi phối hợp 2 kháng sinh

- Pha huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương ứng với độ đục McFarland 0.5 rồi dàn đều canh khuẩn lên mặt 1 đĩa thạch Mueller-Hinton và cấy thuần trên 1 đĩa thạch máu
- Đặt 2 dải giấy kháng sinh vuông góc với nhau, giao nhau tại giá trị MIC của mỗi dải kháng sinh thử nghiệm riêng rẽ lên đĩa thạch đã dàn đều vi khuẩn
- Ủ các đĩa thạch trong tủ ấm 16 - 18 giờ
- Đọc kết quả giá trị MIC của cả hai kháng sinh

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC, đĩa cấy thuần đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

a. Tính chỉ số FIC (Fractional Inhibitory Concentration)

FIC của kháng sinh A = MIC của kháng sinh A trong thử nghiệm phối hợp/MIC của kháng sinh A thử nghiệm riêng

FIC của kháng sinh B = MIC của kháng sinh B trong thử nghiệm phối hợp/MIC của kháng sinh B thử nghiệm riêng

Chỉ số FIC = FIC của kháng sinh A/ FIC của kháng sinh B

b. Phiên giải kết quả chỉ số FIC

- Hai kháng sinh có tác dụng hiệp đồng nếu chỉ số FIC ≤ 0.5

- Hai kháng sinh có tác dụng đối kháng nếu chỉ số FIC > 4
- Hai kháng sinh phối hợp không có tác dụng khác biệt nếu chỉ số FIC ≤ 4 và > 0.5

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do thanh giấy kháng sinh và môi trường thực hiện không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.

Những trường hợp tác dụng đối kháng yếu có thể không phát hiện được vì vùng ức chế nằm dưới vùng bắt chéo của hai thanh E-test.

Sai sót có thể gặp khi:

- Lẫn hai hay nhiều chủng vi khuẩn
- Huyền dịch vi khuẩn pha không đảm bảo đúng tiêu chuẩn (quá loãng hoặc quá đặc) hoặc để quá lâu mới làm các bước tiếp theo.

Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

127. Vi khuẩn kỵ khí nuôi cấy và định danh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và định danh vi khuẩn kỵ khí gây bệnh bằng hệ thống tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi khuẩn được định danh bằng hệ thống tự động dựa trên tính chất sinh vật hóa học của vi khuẩn hoặc bằng phương pháp khối phổ dựa trên tính chất của protein vi khuẩn.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường nuôi cấy kỵ khí
- Môi trường thạch máu thông thường
- Môi trường thạch máu kỵ khí
- Thuốc nhuộm đỏ Fucsin
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Thuốc nhuộm xanh methylen
- Túi tạo môi trường hiếu khí
- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Nước cất
- Dầu soi kính
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que gồ xử lý bệnh phẩm

- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đầu tip loại 1000 μ l
- Đầu tip loại 1 μ l
- Lam kính
- Vật tư cần thiết định danh theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Que cấy nhựa
- Tăm tre
- Tube Eppendorf
- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Chày, cối sứ
- Chủng chuẩn
- Hộp nuôi cấy kỵ khí
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục

- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Tất cả các loại bệnh phẩm được chỉ định nuôi cấy tìm vi khuẩn kỵ khí gây bệnh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 120-168 giờ (5 – 7 ngày) có thể lâu hơn cho những loài vi khuẩn mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập
- Cho đĩa vào hộp nuôi cấy và cho túi tạo môi trường kỵ khí vào hộp, đóng kín.
- Ủ trong tủ ấm 35-37°C.
- Theo dõi mỗi 48 giờ.
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ, nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng phương pháp khối phổ hoặc hệ thống định danh tự động.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn gây bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tất cả các thao tác kỹ thuật bên ngoài môi trường kị khí quá lâu có thể làm chết vi khuẩn.
- Khí trường sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn phải đảm bảo đúng nồng độ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

128. *Helicobacter pylori* nuôi cấy, định danh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nuôi cấy, phân lập và định danh vi khuẩn *Helicobacter pylori* từ mảnh sinh thiết dạ dày.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Mảnh mô dạ dày sinh thiết được nghiền nhỏ và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc cho *H. pylori*. Khuẩn lạc nghi ngờ *H. pylori* sẽ được định danh dựa trên đặc điểm về hình thái học, một số tính chất sinh vật hóa học hoặc dữ liệu protein.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường nuôi cấy, phân lập chọn lọc cho *H. Pylori*
- Môi trường cấy chuyển chủng
- Canh thang BHI glycerol 20%
- Canh thang BHI
- Thuốc nhuộm đỏ Fucsin
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Oxidase
- Urease
- Dung dịch H₂O₂
- Túi tạo môi trường vi hiếu khí
- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Nước cất
- Dầu soi kính
- Cồn 70%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng

- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que gồ xử lý bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đầu tip loại 1000 μ l
- Đầu tip loại 1 μ l
- Lam kính
- Que cấy nhựa
- Tăm tre
- Tube Eppendorf
- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Chày, cối sứ
- Chủng chuẩn
- Hộp nuôi cấy vi hiếu khí
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH

- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mảnh sinh thiết dạ dày.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 14 ngày.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Nghiền nhỏ bệnh phẩm bằng chày và cối vô trùng.
- Dùng tăm bông vô trùng nhúng vào BHI lấy mảnh bệnh phẩm đã nghiền ria lên đĩa môi trường chọn lọc cho *H. pylori*.
- Cho đĩa vào hộp nuôi cấy và cho túi tạo vi khí trường vào hộp, đóng kín.
- Ủ trong tủ ấm 35-37°C.
- Theo dõi mỗi 72 giờ.
- Khuẩn lạc nghi ngờ: S, trong nhỏ lấp lánh, đường kính 0,2 - 0,5mm hoặc có thể 2-3mm
- Nhuộm soi có hình cánh én, bắt màu Gram âm

- Test urease (+), catalase (+), oxidase (+)
- Định danh theo hướng dẫn của nhà sản xuất hệ thống định danh sử dụng

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Dương tính: Phân lập và định danh được *H. pylori*.
- Âm tính: Không có vi khuẩn mọc hoặc không phân lập được *H. pylori* sau 15 ngày.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nhiễm nấm từ bệnh phẩm mảnh sinh thiết dạ dày hoặc từ môi trường do nuôi cấy dài ngày có thể mọc lẫn át *H. pylori*. Bệnh phẩm ít có thể không đủ để phát hiện được sự có mặt của vi khuẩn trong bệnh phẩm.
- Cần sử dụng môi trường chọn lọc cao cho *H. pylori*, ức chế sự phát triển của các vi khuẩn và vi nấm khác. Tốt nhất lấy được 4 mảnh sinh thiết dạ dày.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

129. Vi khuẩn vi hiếu khí nuôi cấy và định danh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và định danh vi khuẩn vi hiếu khí gây bệnh bằng hệ thống tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi khuẩn được định danh bằng hệ thống tự động dựa trên tính chất sinh vật hóa học của vi khuẩn hoặc bằng phương pháp khối phổ dựa trên tính chất của protein vi khuẩn.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường nuôi cấy vi hiếu khí
- Môi trường thạch máu thông thường
- Dung dịch Oxydase
- Thuốc nhuộm đỏ Fucsin
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96°
- Lugol
- Thuốc nhuộm xanh methylen
- Túi tạo môi trường vi hiếu khí
- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Nước cất
- Dầu soi kính
- Cồn 70%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que gồ xử lý bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đầu tip loại 1000 μ l

- Đầu tip loại 1 μ l
- Lam kính
- Que cấy nhựa
- Tăm tre
- Tube Eppendorf
- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Chày, cối sứ
- Chủng chuẩn
- Hộp nuôi cấy vi hiếu khí
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện

- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Tất cả các loại bệnh phẩm được chỉ định nuôi cấy tìm vi khuẩn vi hiếu khí gây bệnh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 2 tuần

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập
- Cho đĩa vào hộp nuôi cấy và cho túi tạo vi hiếu khí trường vào hộp, đóng kín.
- Ủ trong tủ ấm 35°C - 37°C.
- Theo dõi mỗi 72 giờ.
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ, nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng phương pháp khối phổ hoặc hệ thống định danh tự động.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.

- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn gây bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tất cả các thao tác kỹ thuật bên ngoài môi trường kị khí quá lâu có thể làm chết vi khuẩn.
- Khí trường sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn phải đảm bảo đúng nồng độ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

130. *Clostridium* nuôi cấy, định danh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và định danh vi khuẩn *C. difficile* bằng phương pháp nuôi cấy.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

C. difficile được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và kết hợp với PCR xác định gen *tdcB* sinh độc tố B.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ Vi sinh/Bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Lam kính
- Dầu soi kính
- Cồn 96 độ lau kính
- Nước muối sinh lý
- Thuốc nhuộm đỏ Fucsin
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Môi trường thạch máu thường
- Môi trường sinh màu chọn lọc *C. difficile*
- Hóa chất định danh khối phổ
- Túi tạo môi trường kị khí
- Bơm kim tiêm
- Bông
- Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)
- Đèn cồn
- Môi trường thạch máu thường
- Acid ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh

- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đầu tip loại 1000 μ l
- Đầu tip loại 1 μ l
- Lam kính
- Vật tư cần thiết định danh theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Que cây nhựa
- Tăm tre
- Tube Eppendorf
- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Chày, cối sứ
- Chủng chuẩn
- Hộp nuôi cấy vi hiếu khí
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại

- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Hệ thống máy PCR
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm: Bệnh phẩm phân lỏng (>3 ml, tốt nhất là 10 -20 ml). Không chấp nhận phân rắn, phân của trẻ dưới ≤ 12 tháng, tã bông ngoáy trực tràng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 120 giờ (5 ngày).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Cấy 50 µl phân lỏng lên môi trường sinh màu chọn lọc cho *C. difficile*.
- Ủ ấm ở 37°C trong 24 - 48 giờ trong điều kiện kỵ khí.
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ trên môi trường sinh màu là các khuẩn lạc của *C. difficile* có màu đen, xám đậm hay xám tùy theo hướng dẫn của nhà sản xuất môi trường.
- Nhuộm Gram và định danh bằng phương pháp khối phổ các định *C. difficile*.
- Sử dụng PCR để xác định các gen mã hoá độc tố toxin A/B từ các khuẩn đã định danh là *C. difficile* để xác định *C. difficile* sinh độc tố.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Phân lập và định danh được *C. difficile* sinh độc tố.

Để xác định độc tố thì đề nghị lấy mẫu bệnh phẩm mới hoặc chuyển mẫu khuẩn lạc nuôi cấy được sang phòng sinh học phân tử và yêu cầu bác sỹ lâm sàng chỉ định làm thêm xét nghiệm *Clostridium difficile* PCR (tham khảo quy trình xét nghiệm).

- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được *C. difficile* sinh độc tố.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nồng độ ủ ấm CO₂ không đủ tiêu chuẩn.
- Nhỏ dung dịch không chính xác.
- Mẫu phân không thuần nhất có thể ảnh hưởng đến kết quả nuôi cấy. Do vậy, cần trộn kỹ phân trước khi tiến hành nuôi cấy.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

131. Vi khuẩn kháng định

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nuôi cấy, phân lập và định danh vi khuẩn gây bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học, dữ liệu protein và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường nuôi cấy
- Môi trường cấy chuyển chủng
- Canh thang BHI glycerol 20%
- Canh thang BHI
- Thuốc nhuộm đỏ Fucsin
- Thuốc nhuộm tím Gentian
- Cồn tẩy 96 độ
- Lugol
- Oxidase
- Urease
- Dung dịch H₂O₂
- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Nước muối 0.45%
- Dầu soi kính
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng*

- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đầu tip loại 1000 μ l
- Đầu tip loại 200 μ l
- Lam kính
- Vật tư cần thiết định danh theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Que cấy nhựa
- Tăm tre
- Tube Eppendorf
- Ống tube định danh 5ml
- Giấy lau bề mặt
- Giá đựng ống nghiệm
- Hộp lưu chủng
- Cốc đựng rác thải y tế
- Túi đựng đầu tip thải
- Đèn cồn
- Chủng chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH

- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 200 µl đến 1000 µl
- Cassette có dán mã

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Chủng vi khuẩn gây bệnh mọc trên đĩa nuôi cấy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 48 – 72 giờ (2 – 3 ngày) có thể lâu hơn cho những loài vi khuẩn mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Nhuộm soi bệnh phẩm, đánh giá sơ bộ, có thể định danh ngay các tính chất sinh vật hoá học đơn giản và định danh bằng phương pháp khối phổ nếu chủng vi khuẩn mới.
- Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập nếu chủng vi khuẩn cũ, ủ trong tủ ấm 35-37°C, điều kiện khí trường phù hợp. Nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hoá học đơn giản và định danh bằng phương pháp khối phổ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Chủng vi khuẩn không thuần.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

132. Vi khuẩn định danh PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Chẩn đoán nhanh vi khuẩn trực tiếp từ bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý

Sử dụng cặp mồi có trình tự đặc hiệu để xác định sự có mặt của gene đặc trưng của vi khuẩn gây bệnh bằng kỹ thuật PCR. Sự có mặt của gen được xác định thông qua so sánh kích thước của sản phẩm PCR với thang ADN chuẩn trên gel agarose điện di.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiết trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy PCR
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex

- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi khuẩn đã được nuôi cấy thuần hoặc mẫu bệnh phẩm là máu, dịch não tủy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu vi khuẩn chuẩn hoặc mẫu vi khuẩn đã được định danh trước đó, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix (MMX) và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Chia MMX vào mỗi ống phản ứng PCR.

Quy trình PCR

Chuyển 5 µl sản phẩm tách chiết DNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.

- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp ảnh gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, PC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện

di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chúng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm

- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

133. Vi khuẩn định danh real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Định danh vi khuẩn từ khuẩn lạc hoặc trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Khuẩn lạc từ môi trường nuôi cấy hoặc các bệnh phẩm sinh học của người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Sử dụng chứng nội nội sinh cho các loại bệnh phẩm, trừ nước tiểu.
- Trong bộ kit có chứng nội ASTI
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Hút Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR:* Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.

- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.

Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2 Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

$\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

$\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

$\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

$\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

134. Vi khuẩn real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm có thể khác nhau tùy loại vi khuẩn gây bệnh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Sử dụng chứng nội nội sinh cho các loại bệnh phẩm, trừ nước tiểu.
- Trong bộ kit có chứng nội ASTI
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Hút Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* Real-time PCR: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.
- Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2 Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
- ⇒ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
- ⇒ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
- ⇒ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
- ⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng ⇒ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber; CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

135. *Leptospira* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính RNA đặc trưng của *Leptospira* trong các mẫu bệnh phẩm sinh học của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Leptospira* Real-TM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh Cái
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động (nếu có)
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu có chất chống đông EDTA, các loại dịch, nước tiểu, mô sinh thiết đã được đồng nhất và hoà trong dung dịch PBS vô trùng được đựng trong lọ vô trùng không chứa môi trường vận chuyển.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Trước khi tách chiết cho chứng nội (IC) vào từng giếng nhỏ bệnh phẩm.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chuẩn bị ống Master Mix với tỷ lệ các thành phần như hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Vortex và ly tâm ống MMX khoảng 2-3 giây.
- Chia Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.
- * *Real-time PCR:* Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.
- Thêm 10 µl RNA đã tách chiết vào ống tương ứng. Trộn đều.
- Thêm 10 µl RT-eluent vào ống chứng âm (NC)
- Thêm Leptospira cDNA C+ vào ống chứng dương (PC)

- Đóng nắp và chuyển các ống vào máy Real time theo sơ đồ vị trí mẫu.
- Chọn màu FAM, HEX cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy realtime PCR hoạt động (tùy theo máy real-time PCR sử dụng để cài đặt chu trình nhiệt phù hợp).
- Thiết bị dạng Rotor:

Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian	Kênh màu	Chu kỳ
Ủ	50	30 phút	-	1
Ủ	95	15 phút	-	1
Chu kỳ 1	95	20 giây	-	10
	65	50 giây	-	
	72	20 giây	-	
Chu kỳ 2	95	20 giây	-	38
	61	50 giây	FAM, HEX	
	72	20 iây	-	

- Thiết bị dạng đĩa hoặc modular:

Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian	Kênh màu	Chu kỳ
Ủ	50	30 phút	-	1
Ủ	95	15 phút	-	1
Chu kỳ 1	95	20 giây	-	10
	65	50 giây	-	
	72	20 giây	-	
Chu kỳ 2	95	20 giây	-	40
	61	60 giây	FAM, HEX	
	72	20 iây	-	

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

*Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt yêu cầu:

- Chứng âm: đường ngưỡng không vượt quá tín hiệu nền.
- Chứng dương và IC đạt yêu cầu. Nếu các mẫu chứng không đạt kết quả như mong đợi (xem bảng kết quả các mẫu đối chứng), cần chạy lại toàn bộ mẫu và đối chứng từ bước tách chiết.
- Chứng âm, chứng dương, chứng chuẩn và mẫu XN phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

Có các trường hợp sau:

+ Giới hạn giá trị Ct cho thiết bị dạng rotor:

Chứng/Mẫu bệnh phẩm	Giới hạn giá trị Ct
Chứng nội	26
Chứng dương	25
Máu và dịch não tủy	24.5
Mẫu mô	26.5
Nước tiểu	27
Các loại bệnh phẩm khác	32

+ Giới hạn giá trị Ct cho thiết bị dạng đĩa và modular:

Chứng/Mẫu bệnh phẩm	Giới hạn giá trị Ct
Chứng nội	27
Chứng dương	26
Máu và dịch não tủy	27
Mẫu mô	27
Nước tiểu	29
Các loại bệnh phẩm khác	32

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Leptospira 16s RNA được phát hiện trên kênh JOE/HEX/Cy3/Yellow, IC DNA được phát hiện trên kênh FAM/Green với độ nhạy 5000 copies/ml.

4.2.3. Quy định chạy lại xét nghiệm

- Chứng âm hiển thị đường biểu diễn dương tính.
- Chứng dương hiển thị đường biểu diễn âm tính.
- Chứng nội (IC) và mẫu xét nghiệm cùng hiển thị đường biểu diễn âm tính.
- Những trường hợp có giá trị Ct của mẫu xét nghiệm vượt quá giá trị kết luận dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

$\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

$\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

$\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

$\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

136. *Rickettsia* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của các loài vi khuẩn *Rickettsia*: *Orientia tsutsugamushi* và *Rickettsia typhi* và các loài thuộc chi *Rickettsia.sp* gồm: *R. rickettsii*, *R. prowazekii*, *R. typhi*, *Rickettsia akari*, *R. amblyommii*, *R. australis*, *R. canadensis*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. honei*, *R. massiliae*, *R. montana*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. sibirica*, and *R.slovaca*.) trong huyết tương của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết tương tách từ mẫu máu có chống đông EDTA.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị Master mix cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR:* Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 05 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 05 µl chứng dương và 05 µl chứng âm. Trộn đều bằng pipet lên xuống 3 lần.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa Master mix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:

Step	Pre-incubation (UDG)	Hot Taq Activation	PCR	
	HOLD	HOLD	CYCLE (45 cycles)	
			Denature	Anneal/Extend
Temperature	50 °C	95°C	95 °C	60 °C
Time	4 min	10 min	10 sec	1 min

- Lựa chọn kênh màu **FAM** để phát hiện gen đích của *Orientia tsutsugamushi*
- Phát hiện gen đích của *Rickettsia typhi* ta chọn kênh **HEX/VIC/JOE**
- Phát hiện các loài *Rickettsia* nói chung ta chọn kênh **Cy5**
- Phát hiện gen đích nội chuẩn ta chọn kênh **ROX/TEXAS**
- Thiết lập các ống phản ứng: Chọn “Unknow” cho các mẫu xét nghiệm và các mẫu đối chứng chọn “PC hoặc NC”.
- Tiến hành chạy real-time PCR theo quy trình nhiệt đã chọn

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Điều kiện của phản ứng: Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận. Giá trị định lượng chấp nhận được nếu cả 3 chứng: chứng âm, chứng dương và chứng nội có nghĩa. Các chứng có giá như sau:
 - + Chứng âm: không phát hiện.
 - + Chứng dương: nằm trong khoảng cho phép của nhà sản xuất (đặc hiệu với từng lô thuốc thử).
 - + Chứng nội: với chứng âm và mẫu có nồng độ thấp (10-1000copies) phải có tín hiệu lên ứng với Ct khoảng 27 đến 30.
- Các trường hợp cần kiểm tra lại:
 - + Chứng âm: Nếu chứng âm không hợp lệ thì phải thực hiện lại xét nghiệm cả chứng và toàn bộ lô bệnh phẩm.
 - + Chứng dương: Nếu chứng dương không hợp lệ thì phải làm lại xét nghiệm toàn bộ mẻ chạy.
 - + Chứng nội: không có tín hiệu lên với chứng âm và mẫu có nồng độ thấp (10-1000copies) ứng với Ct khoảng 27 đến 30.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu có tín hiệu FAM, ROX giá trị $Ct \leq 42$ là mẫu dương tính với *Orientia tsutsugamushi*.
- Mẫu có tín hiệu HEX, Cy5, ROX giá trị $Ct \leq 42$ là mẫu dương tính với *Rickettsia typhi*.
- Mẫu có tín hiệu Cy5, ROX tín hiệu dương tính với các loài *Rickettsia* còn lại, không phải 2 loài *Orientia tsutsugamushi* và *Rickettsia typhi*.
- Mẫu có tín hiệu FAM, HEX, Cy5 giá trị $Ct > 42$ là mẫu nghi ngờ nên cần tiến hành kiểm tra lại bằng phương pháp chạy điện di sản phẩm PCR, hoặc tách chiết lại DNA khuôn từ mẫu bệnh phẩm và chạy lại Real time PCR để khẳng định kết quả.
- Mẫu không có tín hiệu FAM, HEX, Cy5 và có tín hiệu ROX là mẫu âm tính
- Mẫu không có tín hiệu FAM, HEX, Cy5, ROX là mẫu bị ức chế, cần tách chiết DNA (có bổ sung nội chuẩn vào mẫu khi tách chiết) và chạy lại real time PCR.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 42$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
- + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
- + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
- + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
- + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

ngoctlv.kcb - Truong Le Van Ngoc - 04/09/2023 - 16:23:00

137. *Hantavirus* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của *Hantavirus* mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý

Đoạn ARN đặc trưng của *Hantavirus* được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR, sau đó được khuếch đại và phát hiện bằng kỹ thuật Real-time PCR sử dụng cặp mồi và probe đặc hiệu. Sự có mặt của *Hantavirus* được xác định dựa trên đường đồ thị huỳnh quang của phản ứng Real-time PCR.

Định nghĩa

- + ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- + RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- + Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên tục
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng

- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy Real-time PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương, dịch cơ thể
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 200 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu *Hantavirus* chuẩn hoặc mẫu *Hantavirus* dương tính đã được xác định. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống OneStep RT-PCR Master mix trong kit sinh phẩm sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Chia Master Mix vào mỗi ống phản ứng PCR:

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂ (25 mM)	4
3	Mồi xuôi	2
4	Mồi ngược	2
5	Probe huỳnh quang	1
6	H ₂ O	11
7	DRA khuôn	5
8	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

- Chuyển sản phẩm tách chiết ARN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ARN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	55	30 phút	1
2	95	5 phút	1
3	95	20 giây	45
	60	1 phút (đọc huỳnh quang)	
4	10	5 phút	1

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Thực hiện phân tích kết quả theo hướng dẫn của loại sinh phẩm hóa chất đang sử dụng.
- Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.
- Chứng âm không có đường huỳnh quang nào xuất hiện hoặc xuất hiện đồ thị huỳnh quang dưới đường giới hạn cơ bản.
- Chứng nội tại phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.
- Đường đồ thị huỳnh quang của mẫu có thể xuất hiện hoặc không xuất hiện trên đường giới hạn, căn cứ vào đó để kết luận kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm: Nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách, phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy
- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có đồ thị huỳnh quang, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có đồ thị huỳnh quang, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có đồ thị huỳnh quang, mẫu chứng âm không có đồ thị huỳnh quang, kết quả đó sẽ được sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

138. *Mycoplasma genitalium* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện RNA từ *Mycoplasma genitalium* (MG) trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

Định nghĩa:

- Ct: threshold cycle (chu kỳ ngưỡng)
- RNA: Ribonucleic Acid
- MSDS - Material Safety Data Sheet (Bảng dữ liệu an toàn hóa chất)
- PBS: Phosphate-Buffered Saline (dung dịch đệm nước muối phosphate)
- PCR: Polymerase chain reaction (Phản ứng khuếch đại chuỗi)

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm STI AMP (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Ethanol
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Pipette Tips, 50 μ L
- Pipette Tips, 1000 μ L
- Integrated Reaction Units
- Ống chứa mẫu chạy máy
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Tăm bông vô trùng
- Panh
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy PCR tự động và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm

- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch âm đạo, dịch niệu đạo, dịch cổ tử cung, bệnh phẩm phụ khoa được thu thập trong dung dịch bảo quản, nước tiểu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Điều kiện bảo quản:

Loại mẫu	Nhiệt độ bảo quản	Thời gian ổn định
Tăm bông dịch cổ tử cung, dịch âm đạo, nước tiểu trong môi trường vận chuyển	2 – 30°C	14 ngày
	-20°C ± 5°C	60 ngày*
Bệnh phẩm phụ khoa trong môi trường PreservCyt Specimens	2 – 30°C	14 ngày
	-20°C ± 5°C	60 ngày*
* Rã đông không quá 4 lần		

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 180 phút (3 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thực hiện bảo trì máy:

- Kiểm tra trạng thái bảo trì ở mục “Overview > Procedures >
- Thực hiện bảo trì nếu đến hạn

Bắt đầu mở chạy:

- Từ màn hình Create Order (Tạo lệnh), chọn xét nghiệm cần chạy (STI).

Bảo dưỡng cuối ngày:

- Hoàn tất công việc vệ sinh máy.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Tính toán

- Xét nghiệm STI là một xét nghiệm định tính. Đối với mỗi tín hiệu đích (CT, NG, TV, hoặc MG), số chu kỳ (CN) khuếch đại được xác định khi hệ thống phát hiện tín hiệu huỳnh quang. Mỗi tín hiệu sẽ được xác định hoặc là “Positive” (Dương tính) nếu CN nhỏ hơn hoặc bằng chu kỳ ngưỡng xét nghiệm cố định hoặc “Negative” (Âm tính) nếu không có CN hoặc CN lớn hơn chu kỳ ngưỡng xét nghiệm. Hệ thống Alinity m tự động báo cáo kết quả trên màn hình làm việc.

Diễn giải kết quả

Xét nghiệm	Kết quả	Diễn giải	Cờ
CT	Dương tính CT	Phát hiện đích CT	
CT	Âm tính CT	Không phát hiện đích CT	
NG	Dương tính NG	Phát hiện đích NG	
NG	Âm tính NG	Không phát hiện đích NG	
TV	Dương tính TV	Phát hiện đích TV	
TV	Âm tính TV	Không phát hiện đích TV	
MG	Dương tính MG	Phát hiện đích MG	
MG	Âm tính MG	Không phát hiện đích MG	

Các kết quả hiển thị trên màn hình sẽ chỉ chứa những kết quả được yêu cầu trong lệnh xét nghiệm.

Nếu một mẫu bệnh phẩm nhận được cờ cảnh báo và mã thông báo cho bất cứ xét nghiệm riêng nào, thì mẫu bệnh phẩm phải được xét nghiệm lại bằng cách tạo lệnh xét nghiệm cho những xét nghiệm không cho ra kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể

lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

6.1. Phát hiện ức chế và/hoặc sự thiếu hụt tế bào

Số chu kỳ (CN) của mẫu chứng nội bộ IC của tất cả các mẫu phải nằm trong khoảng giá trị hợp lệ. Một lượng IC (mẫu chứng nội bộ) đã xác định, nhất quán có trong từng phản ứng PCR và được đo trên hệ thống nhằm xác nhận rằng không có ức chế PCR nào có trong mẫu. Xét nghiệm STI cũng phát hiện được một DNA người nội sinh (CC: Mẫu chứng tế bào) để đánh giá sự hợp lệ của thể tích mẫu, hiệu quả chiết tách mẫu, và hiệu quả khuếch đại.

- Đối với các mẫu dương tính: Nếu IC CN hoặc CC CN nằm ngoài khoảng, nhưng (các) đích xét nghiệm trong mẫu đó lại Dương tính (Positive), thì mẫu sẽ có kết quả Dương tính. Cờ IC hoặc CC sẽ hiển thị kế bên kết quả dương tính.
- Đối với các mẫu âm tính: Nếu IC CN hoặc CC CN nằm ngoài khoảng và (các) đích xét nghiệm trong mẫu đó lại không Dương tính (not Positive), thì không có kết quả nào được báo cáo cho đích đó và sẽ có mã thông báo.

6.2. Mẫu chứng

- + Khuyến cáo xét nghiệm một mẫu chứng âm tính STI Negative CTRL và một mẫu chứng dương tính STI Positive CTRL, định kỳ tối thiểu 48 giờ một lần để theo dõi hiệu năng của xét nghiệm và hệ thống. Phải có được các kết quả hợp lệ cho tất cả các mức mẫu chứng trước khi báo cáo kết quả mẫu xét nghiệm.

Cờ báo lỗi mẫu hoặc Mã thông báo sẽ hiển thị khi một kết quả mẫu chứng không hợp lệ.

- + Chứng dương: Phải dương tính với các tác nhân đích. Nếu mẫu chứng cho một đích xét nghiệm (CT, NG, TV, hoặc MG) không hợp lệ, phải xét nghiệm lại tất cả mẫu của mẻ chạy.
- + Chứng âm: CT, NG, TV, hoặc MG không được có mặt trong mẫu chứng âm tính.

6.3. Kiểm tra chất lượng:

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (QC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

ngoctlv.kcb - Truong Le Van Ngoc - 04/09/2023 - 16:23:00

139. MTB-NTM (Mycobacterium tuberculosis-Non tuberculous mycobacteria) Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện Xác định DNA đặc trưng của MTB & NTM trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR đa tác nhân.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR sử dụng công nghệ độc quyền “Dual Priming Oligonucleotide (DPOTM).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: đờm, các loại dịch sinh học (dịch phế quản, dịch não tủy, dịch màng bụng, dịch màng tim, nước tiểu, mủ..), phân và mô sinh thiết.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a) Xử lý đờm bằng dung dịch EZ:

Thêm thể tích tương đương của Dung dịch EZ (Cat.No. K-4418-4) vào mẫu đờm và lắc trộn mạnh bằng máy vortex trong 3 phút. Sau đó ủ mẫu trong 20 phút ở nhiệt độ phòng.

Lưu ý: Nếu mẫu quá nhớt, thêm gấp đôi thể tích Dung dịch EZ hoặc kéo dài thời gian ủ lên đến 30 phút.

b) Dịch phế quản (BAL):

- Trộn mẫu vừa đủ bằng máy vortex trong 1 phút. Chuyển 1 ml sang tube eppendorf 1,5 ml vô trùng

Lưu ý: Nếu mẫu nhớt, thêm NaOH 200 μl 10 N và ủ ở nhiệt độ phòng (25 ° C) trong 15 phút.

- Ly tâm ở tốc độ 9.000 vòng / phút trong 5 phút và loại bỏ phần nước nổi phía trên.
- Thêm 1 ml 1x PBS hoặc nước muối thông thường, xoáy trong 30 giây, ly tâm mẫu ở tốc độ 9.000 vòng / phút trong 5 phút, và loại bỏ phần nổi phía trên. Lặp lại bước giặt này 3 lần.

Lưu ý: Nếu lớp trắng hình thành phía trên viên tế bào, hãy loại bỏ lớp có phần nổi phía trên và để lại viên tế bào

- Phần cặn còn lại được sử dụng để tách chiết DNA.

c) Nước tiểu:

- Chuyển 5 ~ 10 ml mẫu nước tiểu vào ống hình nón
- Ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng / phút trong 20 phút và loại bỏ phần nước nổi phía trên.
- Phần cặn còn lại được sử dụng để tách chiết DNA.

d) Mảnh sinh thiết

- Cắt hoặc nghiền mẫu mô trong bình vô trùng.
- Hòa tan trong 1 mL dung dịch PBS 1X.
- Ly tâm ở 15.000 x g (13.000 vòng / phút) trong 5 phút và loại bỏ phần nổi phía trên bằng pipette.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- 10 µL IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

** Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR*

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia 15 µl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

** Real-time PCR:* Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 5 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 5 µl chứng dương và 5 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 20 µl.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt và kênh màu huỳnh quang theo chương trình của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Diễn giải kết quả theo bảng sau:

Phân tích	Kênh màu	Mẫu		Chứng dương	
		Giá trị Ct	Kết quả	Giá trị Ct	Kết quả
MTB	FAM	< 40	Dương tính (+)	< 25	Hợp lệ
		≥ 40	Âm tính (-)	≥ 25	Không hợp lệ
		N/A		N/A	
Mycobacteria	Cal Red 610	< 38	Dương tính (+)	< 25	Hợp lệ
		≥ 38	Âm tính (-)	≥ 25	Không hợp lệ
		N/A		N/A	
Internal Control	Quasar 670	< 35	Dương tính (+)	< 25	Hợp lệ
		≥ 35	Âm tính (-)	≥ 25	Không hợp lệ
		N/A		N/A	

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: ⇒ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử ⇒ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 38$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
⇒ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

⇒ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

⇒ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

- Chứng dương bị hỏng ⇒ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.

4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

ngoctlv.kcb_Truong Le Van Ngoc_04/09/2025 10:23:29

140. *Candida* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của các loại nấm *Candida* sau: *Candida albicans* (CA), *Candida krusei* (CK), *Candida glabrata* (CG), *Candida dubliniensis* (CD), *Candida parapsilosis* (CP), *Candida tropicalis* (CPt), *Candida lusitanae* (CL) trong mẫu bệnh phẩm của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm dựa trên công nghệ MuDT™ (Công nghệ phát hiện đa đích) và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Tăm bông vô trùng
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Nước tiểu, tăm bông lấy bệnh phẩm đường sinh dục, tế bào cổ tử cung.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy trình của phòng xét nghiệm.

- Nước tiểu: Để bệnh phẩm cân bằng ở nhiệt độ phòng. Lấy 1 ml nước tiểu ly tâm 15000 x g (13000 rpm) trong 15 phút. Loại bỏ nước nổi, thu cặn và hòa tan trong nước muối bằng cách lắc trộn trên máy vortex.
- Dịch ống cổ tử cung: Để bệnh phẩm cân bằng ở nhiệt độ phòng. Lấy 1 ml dịch tế bào ly tâm 15000 x g (13000 rpm) trong 15 phút. Loại bỏ nước nổi, thu cặn và hòa tan trong nước muối bằng cách lắc trộn trên máy vortex.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Sử dụng chứng nội sinh cho các loại bệnh phẩm, trừ nước tiểu.
- Trong bộ kit có chứng nội ASTI
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

1 pư	N pư	Thành phần
------	------	------------

5 μ L	N * 5	4X CA MOM (tương ứng với từng bộ kit)
5 μ L	N * 5	EM1
5 μ L	N * 5	RNase-free water
15 μ L	N * 15	Tổng thể tích Mastermix

- Hút 15 μ L Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 5 μ L DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.
- Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2 Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

$\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

$\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

$\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

$\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

141. Vi nấm Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của vi nấm trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml

- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần, huyết tương, dịch phế quản (BAL), đờm.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Ước tính từ lúc bắt đầu nhận bệnh phẩm cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Sử dụng chứng nội nội sinh cho các loại bệnh phẩm, trừ nước tiểu.
- Trong bộ kit có chứng nội ASTI
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Hút Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.
- Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2 Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiệm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

⇒ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

⇒ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

⇒ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình .

- Chứng dương bị hỏng ⇒ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

ngoctlv.kcb - Truong Le Van Ngoc - 04/09/2023 - 16:23:00

142. *Pneumocystis jirovecii* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng DNA đặc trưng của *Pneumocystis jirovecii* (PJ) trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Pneumocystis Kit (VD hoặc tương đương)
- Pneumocystis Standard
- Pneumocystis Positive Control
- CPE – Internal Control
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- Panh
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch phế quản (BAL), đờm. Bệnh phẩm được đựng trong lọ vô trùng không chứa môi trường vận chuyển.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Quy trình xét nghiệm *Pneumocystis jirovecii* Real-time PCR với hệ thống máy PCR tự động bao gồm 3 bước:

- Xác nhận hệ thống máy và hóa chất đã sẵn sàng sử dụng.
- Cài đặt chu trình xét nghiệm.
- Đánh giá và xuất dữ liệu kết quả

* **Xác nhận hệ thống máy đã sẵn sàng**

- Bật máy, chọn chế độ Login “CLOSED”
- Xác nhận đường hiệu chuẩn đã chạy và còn giá trị áp dụng.
- Xác nhận kết quả chạy kiểm chuẩn đã chạy và còn giá trị áp dụng.
- Chọn chế độ chạy tương ứng với xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

• **Cài đặt chu trình xét nghiệm**

Chọn một trong 4 chu trình chạy sau:

- A. Chạy kết hợp (Tách chiết + PCR).
- B. Chỉ chạy khuếch đại (PCR Only)
- C. Chạy hiệu chuẩn (PCR Only)
- D. Chạy kiểm chuẩn (PCR Only)

* **Chuẩn bị sinh phẩm cho tách chiết và phản ứng Realtime PCR**

- **Chuẩn bị cho chu trình A. Chạy kết hợp (Tách chiết + PCR):**
 - Rã đông các sinh phẩm cần thiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất
 - Chọn “Perform Run” từ màn hình “Home”
 - Check các thông số cài đặt: Extraction Input Volume, Extracted Elute Volume,... theo Protocol tương ứng.
 - Nạp mẫu bệnh phẩm và ID vào máy (nhập tay hoặc quét barcode)
 - Chọn đúng protocol tương ứng trong cột “Assay”, và Protocol hiển thị có ghi “Extract + PCR”.
 - Nạp Nội chứng CPE, PCR Mix ở mục “Inventory Block”, chọn “Next”
 - Nạp Vật tư tiêu hao (đầu côn, tube thu mẫu,...) vào khu vực “Inventory Area”, chọn “Next”
 - Nạp PCR Cassette, cartridge tách chiết, chọn “Next”.

- Kiểm tra tất cả các mẫu bệnh và hóa chất, vật tư tiêu hao cần thiết rồi đóng nắp thiết bị.
- Chọn “Start” để bắt đầu chạy.
- Sau khi quá trình chạy kết thúc, mẫu bệnh phẩm được tách chiết trong ống “Elute tube” có thể đóng nắp và bảo quản ở -20°C .
- *Chuẩn bị cho chu trình B, C, D:* tương tự như chu trình A nhưng thay đổi chọn protocol, nạp hóa chất và vật tư tiêu hao cần thiết tương ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

- Đường hiệu chuẩn cho Lot thuốc thử dùng trong lần chạy phải còn giá trị áp dụng (trong vòng 60 ngày sau khi đường hiệu chuẩn đã được chấp nhận theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất $\text{STD } 10^5 \text{ Ct} < 25$ và $R^2 > 0.99$ hoặc tiêu chuẩn của phòng xét nghiệm)
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM và AP525 âm tính.
- Chứng dương phải có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

TT	Màu FAM	Màu AP525	Kết quả
1	+	$\pm$	Dương tính với <i>Pneumocystis jirovecii</i>
2	-	+ ($\text{Ct} < 36$)	Âm tính với <i>Pneumocystis jirovecii</i>
3	-	+ ($\text{Ct} > 36$)	Không có giá trị
4	-	-	Không có giá trị

Nếu kết quả rơi vào trường hợp thứ 3 hoặc 4 thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

143. *Aspergillus* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của *Aspergillus spp.* trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Aspergillus* PCR kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm

- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần, huyết tương, dịch phế quản (BAL), đờm.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (μl)	25	50	100	200
Thể tích IS (μl)	2,5	5	10	20

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia 30 μl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* Real-time PCR: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 10 μl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 μl chứng dương và 10 μl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 40 μl.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:

- Màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện *Aspergillus*, đồng thời cả hai màu FAM & Cy5 cho phát hiện *Aspergillus spp.* & *Aspergillus terreus*, màu HEX cho chứng nội.
- Chu kỳ nhiệt:
 - + 1 chu kỳ: 37°C/2 phút
 - + 1 chu kỳ: 95 °C/10 phút
 - + 45 chu kỳ: 95°C/5 giây
 - 60 °C/40 giây – đọc sản phẩm
 - 72°C/20 giây
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM & Cy5 dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính, đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM & Cy5 âm tính.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

TT	Màu FAM	Màu Cy5	Màu HEX	Kết quả
1	+	-	±	Dương tính với <i>Aspergillus spp.</i>
2	+	+	±	Dương tính với <i>Aspergillus spp.</i> & <i>Aspergillus terreus</i>
3	-	+	±	Dương tính với <i>Aspergillus terreus</i>
4	-	-	+ (Ct<38)	Âm tính
5	-	-	+ (Ct>38)	Không có giá trị

Nếu kết quả rơi vào trường hợp thứ 5 thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT).
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

144. *Pneumocystis carinii* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và định lượng DNA đặc trưng của *Pneumocystis carinii* (PC) trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Pneumocystis Kit (VD hoặc tương đương)
- Pneumocystis Kit
- Pneumocystis Standard
- Pneumocystis Positive Control
- CPE – Internal Control
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- Panh
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khẩn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch phế quản (BAL), đờm. Bệnh phẩm được đựng trong lọ vô trùng không chứa môi trường vận chuyển.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Quy trình xét nghiệm *Pneumocystis carinii* Real-time PCR với hệ thống máy PCR tự động bao gồm 3 bước:

- Xác nhận hệ thống máy và hóa chất đã sẵn sàng sử dụng.
- Cài đặt chu trình xét nghiệm.
- Đánh giá và xuất dữ liệu kết quả

* *Xác nhận hệ thống máy đã sẵn sàng*

- Bật máy, chọn chế độ Login “CLOSED”
- Xác nhận đường hiệu chuẩn đã chạy và còn giá trị áp dụng.
- Xác nhận kết quả chạy kiểm chuẩn đã chạy và còn giá trị áp dụng.
- Chọn chế độ chạy tương ứng với xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

• *Cài đặt chu trình xét nghiệm*

Chọn một trong 4 chu trình chạy sau:

- A. Chạy kết hợp (Tách chiết + PCR).
- B. Chỉ chạy khuếch đại (PCR Only)
- C. Chạy hiệu chuẩn (PCR Only)
- D. Chạy kiểm chuẩn (PCR Only)

* *Chuẩn bị sinh phẩm cho tách chiết và phản ứng Realtime PCR*

• *Chuẩn bị cho chu trình A. Chạy kết hợp (Tách chiết + PCR):*

- Rã đông các sinh phẩm cần thiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Chọn “Perfrom Run” từ màn hình “Home”

- Check các thông số cài đặt: Extraction Input Volume, Extracted Elute Volume,... theo Protocol tương ứng.
- Nạp mẫu bệnh phẩm và ID vào máy (nhập tay hoặc quét barcode)
- Chọn đúng protocol tương ứng trong cột “Assay”, và Protocol hiển thị có ghi “Extract + PCR”.
- Nạp Nội chủng CPE, PCR Mix ở mục “Inventory Block”, chọn “Next”
- Nạp Vật tư tiêu hao (đầu côn, tube thu mẫu,...) vào khu vực “Inventory Area”, chọn “Next”
- Nạp PCR Cassette, cartridge tách chiết, chọn “Next”.
- Kiểm tra tất cả các mẫu bệnh và hóa chất, vật tư tiêu hao cần thiết rồi đóng nắp thiết bị.
- Chọn “Start” để bắt đầu chạy.
- Sau khi quá trình chạy kết thúc, mẫu bệnh phẩm được tách chiết trong ống “Elute tube” có thể đóng nắp và bảo quản ở -20°C .
- *Chuẩn bị cho chu trình B, C, D:* tương tự như chu trình A nhưng thay đổi chọn protocol, nạp hóa chất và vật tư tiêu hao cần thiết tương ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

- Đường hiệu chuẩn cho Lot thuốc thử dùng trong lần chạy phải còn giá trị áp dụng (trong vòng 60 ngày sau khi đường hiệu chuẩn đã được chấp nhận theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất $\text{STD } 10^5 \text{ Ct} < 25$ và $R^2 \geq 0.99$ hoặc tiêu chuẩn của phòng xét nghiệm)
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM và AP525 âm tính.
- Chứng dương phải có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

TT	Màu FAM	Màu AP525	Kết quả
1	+	$\pm$	Dương tính với <i>Pneumocystis jirovecii</i>
2	-	+ (Ct<36)	Âm tính với <i>Pneumocystis jirovecii</i>
3	-	+ (Ct>36)	Không có giá trị
4	-	-	Không có giá trị

Nếu kết quả rơi vào trường hợp thứ 3 hoặc 4 thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

145. Virus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện acid nucleic đặc trưng của virus trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml

- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương, máu toàn phần, nước tiểu, mô sinh thiết (kích thước tối thiểu 1 x 1 x 1 mm),....
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng}$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* Real-time PCR: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:
- Cài đặt màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Chu kỳ nhiệt: Cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình .
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

146. Zika virus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính RNA đặc trưng của Zika virus trong bệnh phẩm Máu toàn phần, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, mẫu mô và các dịch sinh học khác của người bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR, là phản ứng PCR trong đó phân tử RNA được phiên mã ngược tạo cDNA và kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, mẫu mô và các dịch sinh học khác. Tốt nhất là huyết thanh và nước tiểu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Thu nhận và xử lý mẫu: Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết RNA nếu cần.
- Hồi chỉnh chứng dương.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Bóc lớp vỏ nhôm che phủ trên đĩa hoặc tube phản ứng.
- Cho dung dịch hồi chỉnh vào mỗi giếng.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch RNA tách chiết vào từng giếng, đậy nắp, ly tâm nhẹ. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Bật máy real-time PCR. Bật máy tính khởi động chương trình real-time PCR trước khi chạy mẫu ít nhất 15 phút.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu Cy5 (Zika), FAM (Dengue), ROX (Chikungunya) cho mẫu, chứng dương và chứng âm và HEX (hoặc JOE/VIC) cho chứng nội.

- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

***Chú ý:**

- Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.
- Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu Cy5, FAM, ROX dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính hoặc âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu Cy5, FAM, ROX âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng tương ứng với màu của từng tác nhân và bắt đầu từ chu kỳ 40 trở về trước. Mẫu dương tính với Dengue virus khi đường biểu diễn tương ứng với màu Cy5 dương tính. Một mẫu có thể dương tính với 1 trong 3 tác nhân hoặc dương tính đồng thời cả 3 tác nhân.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu từ sau chu kỳ 40 → đề nghị lấy mẫu lại để thực hiện xét nghiệm hoặc thực hiện lại xét nghiệm sau 1-3 tháng.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể

lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
- + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
- + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
- + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
- + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

147. *Parvo virus B19* đo tải lượng Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng và đo tải lượng Parvo virus B19 trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh, bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Parvovirus B19 Real-TM Quant (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động (nếu có)
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, dịch ối, đờm, tã bông thấm dịch.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- *Huyết tương:* Máu toàn phần được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA. Huyết tương được tách ra bằng cách ly tâm 800-1.600 x g trong 20 phút. Huyết tương có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết tương có thể được bảo quản ở -18°C lên đến một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.
- *Dịch ối:* được bảo quản trong ống Eppendorf. Ly tâm ở 10.000g/ phút trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi và giữ lại khoảng 100 µl dung dịch cho tách chiết DNA.
- *Mẫu đờm:* thêm mẫu đờm vào nước muối sinh lý (tỉ lệ 1:1) và vortex mạnh. Ly tâm 10.000g/phút trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi và giữ lại khoảng 100 µl dung dịch cho tách chiết DNA.
- *Mẫu tăm bông:* cho que tăm bông vào ống 1.5 ml và thêm 0.2 ml môi trường vận chuyển. Lắc que tăm bông mạnh trong ống môi trường khoảng 15-20 giây. Khuyến cáo xử lý mẫu ngay sau khi thu nhận. Bảo quản mẫu ở 2-8°C không quá 24 giờ, hoặc bảo quản ở tủ đông -20 đến -80°C.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Trước khi tách chiết cho chứng nội (IC) vào từng giếng nhỏ bệnh phẩm.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Real-time PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng chuẩn QS1 và QS2 (mỗi loại thực hiện 2 lần).

- Chuẩn bị ống Master Mix với tỷ lệ các thành phần như hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Vortec và ly tâm ống MMX khoảng 2-3 giây.
- Chia 15 μ l Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Thêm 10 μ l DNA đã tách chiết vào ống tương ứng, 10 μ l QS và 10 μ l chứng âm. Thể tích cuối cùng là 25 μ l. Trộn đều.
- Đóng nắp và chuyển các ống vào máy Real time theo sơ đồ vị trí mẫu.
- Màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện chứng nội, JOE/HEX/Cy3 cho phát hiện Parvovirus B19.
- Chu kỳ nhiệt: Thiết lập chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Phân tích định tính

- Mẫu được xem là dương tính cho Parvovirus B19 nếu giá trị Ct trên kênh JOE(Yellow)/HEX/Cy3 khác 0 ($Ct < 40$).
- Mẫu âm tính khi giá trị $Ct < 30$ trên kênh FAM (Green) và không xuất hiện tín hiệu huỳnh quang trên kênh JOE (Yellow)/HEX/Cy3.
- Kết quả không hợp lệ nếu giá trị Ct của mẫu trên kênh JOE(Yellow)/HEX/Cy3 không xuất hiện trong khi giá trị Ct trên kênh FAM (Green) hoặc không có hoặc cao hơn giá trị giới hạn ($Ct > 33$). Cần lặp lại xét nghiệm với mẫu như vậy.

Phân tích đo tải lượng

Cho các chứng và mẫu bệnh, tính toán nồng độ của Parvovirus B19 sử dụng công thức tính theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Độ nhạy 200 copies/ml và khoảng tuyến tính từ 800 đến 10.000.000 copies/ml.
- Mẫu dương tính trong khoảng tuyến tính: Trả kết quả theo số định lượng tính được.

- Mẫu dương tính > 10.000.000 copies/ml: Pha loãng mẫu 1:10 và thực hiện lại xét nghiệm.
- Mẫu dương tính < 800 copies/ml: Trả kết quả < 800 copies/ml.
- Mẫu âm tính khi giá trị Ct < 30 trên kênh FAM và không xuất hiện tín hiệu huỳnh quang trên kênh HEX.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu (Ct > 36): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

148. HDV Real - time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện RNA virus viêm gan D trong huyết tương người bằng phương pháp real time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Kít tách RNA
- HDV Standard
- Ependoff 1,7ml
- Ependoff 0,2ml
- Ethanol
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 10 µl có lọc
- Đầu côn 100 µl có lọc
- Đầu côn 200 µl có lọc
- Đầu côn 1 ml có lọc
- Bơm kim tiêm
- Panh
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Giấy xét nghiệm
- Sổ lưu kết quả xét nghiệm

- Bút viết kính
- Bút bi
- Mũ
- Alcolpad
- Khẩu trang
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ
- Gòn
- Dây garô
- Cồn
- Khăn lau tay
- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm 2500 x g
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Máy vortex
- Máy Spin
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl – 1000 µl.

2.4. Mẫu bệnh phẩm

- Huyết tương (không sử dụng chất chống đông Heparin) hoặc huyết thanh (có thể sử dụng trong một số trường hợp, nhưng độ nhạy lâm sàng có thể giảm đáng kể do sự kết tủa của các phần tử virus trong giai đoạn co cục máu đông).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Sử dụng chứng nội sinh cho các loại bệnh phẩm, trừ nước tiểu.
- Trong bộ kit có chứng nội
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng real time PCR

Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy real time PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết RNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

Hút Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real time PCR:* Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy real time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR RNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm RNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.
- Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2. Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: Kiểm tra phương pháp tách chiết RNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn. Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn. Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử. Thêm IC trong quá trình tách chiết RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
- Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử acid nucleic đặc trưng.
- Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
- Lặp lại bước tách chiết RNA với bộ thuốc thử mới.
- Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR. Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng. Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn. Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

149. HEV Real - time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt gene đặc trưng của HEV (virus viêm gan E) bằng phương pháp real time PCR.

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Kít tách DNA
- HEV Standard
- Ependoff 1,7ml
- 6 Ependoff 0,2ml
- Ethanol BDH
- Water-DEPC Treated
- Dung dịch nước rửa tay
- Cồn sát trùng tay nhanh
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 10 µl có lọc
- Đầu côn 30 µl
- Đầu côn 200 µl có lọc
- Đầu côn 1 ml có lọc
- Bơm kim tiêm
- Panh
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Bông
- Dây garô
- Cồn
- Găng không có bột tal
- Giấy thấm
- Giấy xét nghiệm
- Sổ lưu kết quả xét nghiệm
- Bút viết kính
- Bút bi
- Mũ
- Khẩu trang
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ
- Khăn lau tay
- Máy real time PCR và hệ thống máy vi tính
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl – 1000 µl.

2.4. Mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1 Các bước thực hiện

- Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến trình kỹ thuật:

- Bộ sinh phẩm HEV Real-time
- Tách chiết RNA
- Thực hiện phản ứng real-time PCR
- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần
- Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube HEV RT PCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR cùng với 1 bộ standard.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

4.2. Nhận định kết quả

Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

4.2.1. Điều kiện phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX đại diện cho chứng nội IC dương tính hoặc âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính

4.2.2. Phân tích mẫu

- Những mẫu dương tính chỉ cần chọn màu FAM để phân tích.
- Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kênh IC (Fam (Green)) yếu hoặc không có tín hiệu: cần phải kiểm tra lại mẫu
 - + Phản ứng PCR bị ức chế.

Xử trí:

Đảm bảo rằng đang sử dụng phương pháp tách chiết RNA được khuyến nghị và làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Điều kiện bảo quản thuốc thử không tuân theo hướng dẫn: kiểm tra điều kiện bảo quản

Điều kiện PCR không đúng hướng dẫn: kiểm tra các điều kiện PCR và để phát hiện IC, chọn kênh huỳnh quang đã thể hiện trong quy trình.

- Bất kỳ tín hiệu nào với Negative PCR Control:

- + Nhiễm bẩn trong quá trình chuẩn bị PCR. Tất cả các kết quả mẫu đều không hợp lệ.

Xử trí:

Khử nhiễm tất cả các bề mặt và dụng cụ bằng natri hypochlorite và ethanol hoặc thuốc thử khử nhiễm nucleic acid đặc biệt.

Dùng pipet phân phối chứng dương ở giếng cuối.

Lặp lại quá trình chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

- Tín hiệu mẫu yếu ($Ct > 37$) trên kênh Joe (Yellow)/Cy3/HEX: kiểm tra lại mẫu:

Negative Control xuất hiện tín hiệu trên kênh Joe (Yellow)/Cy3/HEX của quá trình tách chiết: nhiễm trong quá trình tách chiết RNA. Tất cả các kết quả mẫu đều không hợp lệ.

Xử trí:

Khử nhiễm tất cả các bề mặt và dụng cụ bằng natri hypochlorite và ethanol.

Chỉ sử dụng đầu lọc trong quy trình chiết xuất. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

Lặp lại quá trình chiết RNA với bộ thuốc thử mới.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT).
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, Carey Ann D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

150. Mumps Virus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện gene đặc trưng của Mumps Virus trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Meningitis-V2 Asssay (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch não tủy
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho 10 µl chứng nội MG-V2 IC vào mẫu trước khi tách chiết.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

l pư	N pư	Thành phần
5 µL	N * 5	MG2 MOM (tương ứng với từng bộ kit)
5 µL	N * 5	EM5
5 µL	N * 5	EM5 Buffer
15 µL	N * 15	Tổng thể tích Mastermix

- Hút 15 µl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 5µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 5 µl chứng dương và 5 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 20µl.

- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Màu huỳnh quang: FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Xem xét kết quả nội kiểm (QC). Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

151. Chikungunia virus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định RNA đặc trưng của Chikungunia virus trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Zika, Dengue and Chikungunia Real-time PCR Detection Kit (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, mẫu mô và các dịch sinh học khác. Tốt nhất là huyết thanh và nước tiểu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết RNA nếu cần

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết acid nucleic

Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Bóc lớp vỏ nhôm che phủ trên đĩa hoặc tube phản ứng.
- Cho dung dịch hồi chỉnh vào mỗi giếng.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch RNA tách chiết vào từng giếng, đầy nắp, ly tâm nhẹ. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Bật máy real-time PCR. Bật máy tính khởi động chương trình real-time PCR trước khi chạy mẫu ít nhất 15 phút.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu Cy5 (Zika), FAM (Dengue), ROX (Chikungunya) cho mẫu, chứng dương và chứng âm và HEX (hoặc JOE/VIC) cho chứng nội.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
- $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

⇒ Lắp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng ⇒ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

152. Vi khuẩn định danh giải trình tự gen

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Định danh căn nguyên vi khuẩn phân lập từ mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN gen 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Trình tự nucleotide của gen 16S rRNA sau đó được giải trình tự bằng kỹ thuật sequencing, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để định danh vi khuẩn.

Định nghĩa

- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng

- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR

- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi khuẩn đã được nuôi cấy thuần hoặc bệnh phẩm chỉ chứa 1 căn nguyên vi khuẩn duy nhất
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 24 giờ (1 ngày)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng vi khuẩn chuẩn hoặc chủng vi khuẩn đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR

Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương đảm bảo cho quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR:

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương, chứng NTC và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	4 phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20µL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gen 16S rRNA của mẫu thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là chủng tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$, thì kiểm tra tỷ lệ các chủng nếu chủng nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận mẫu tương đồng với chủng đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có chủng nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide gen 16S rRNA phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

153. Vi khuẩn kháng thuốc giải trình tự gen

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định gen liên quan đến kháng thuốc của vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của các gen kháng thuốc ở vi khuẩn được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu. Trình tự nucleotide của các đoạn ADN này sau được xác định bằng kỹ thuật sequencing, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định tên của gen kháng thuốc.

Định nghĩa

- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2,5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi khuẩn đã được nuôi cấy thuần hoặc bệnh phẩm chỉ chứa 1 căn nguyên vi khuẩn duy nhất
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control) : dùng chủng vi khuẩn chuẩn có chứa gene kháng thuốc chuẩn hoặc chủng vi khuẩn kháng thuốc đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

Lưu ý: mỗi gen kháng thuốc sử dụng 01 cặp mồi xuôi/ngược, số gen kháng thuốc sử dụng số cặp mồi xuôi/ngược tương ứng. Mỗi phản ứng PCR có thể sử dụng đơn mồi hoặc đa mồi

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR:

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

Lưu ý: mỗi cặp mồi xuôi/ngược có nhiệt độ bắt cặp khác nhau

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20µL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự

- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gen liên quan đến kháng thuốc thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là gen tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$ thì kiểm tra tỷ lệ các gen, nếu gen nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận gen tương đồng với gen đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có gen nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide gen kháng thuốc phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
- Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
- Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

154. *Vibrio cholerae* giải trình tự gen

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của vi khuẩn *Vibrio cholerae* trong bệnh phẩm bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của vi khuẩn *Vibrio cholerae* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR, trình tự nucleotide của đoạn ADN này sau đó được xác định bằng kỹ thuật sequencing, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để định danh *Vibrio cholerae*.

Định nghĩa

- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2,5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi khuẩn đã được nuôi cấy thuần hoặc bệnh phẩm chỉ chứa 1 căn nguyên vi khuẩn duy nhất
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng vi khuẩn *Vibrio cholerae* chuẩn hoặc chủng vi khuẩn *Vibrio cholerae* đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	56 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.

- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μ l sản phẩm PCR + 1.5 μ l Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μ l)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20 μ L sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gene đặc trưng của *Vibrio cholerae* thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là chủng *Vibrio cholerae* tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$ thì kiểm tra tỷ lệ các chủng *Vibrio cholerae*, nếu chủng *Vibrio cholerae* nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận tương đồng với chủng *Vibrio cholerae* đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có chủng *Vibrio cholerae* nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide gen đặc trưng của *Vibrio cholerae* phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

155. *Neisseria gonorrhoeae* kháng thuốc giải trình tự gen

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định gen liên quan đến kháng thuốc của vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae* bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng kỹ thuật sequencing để xác định trình tự nucleotide gen liên quan đến kháng thuốc của vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định tên của gen kháng thuốc.

Định nghĩa:

- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN.
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi khuẩn đã được nuôi cấy thuần hoặc bệnh phẩm chỉ chứa 1 căn nguyên vi khuẩn duy nhất
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng *Neisseria gonorrhoeae* chuẩn có chứa gene kháng thuốc hoặc chủng *Neisseria gonorrhoeae* kháng thuốc đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

Lưu ý: mỗi gen sử dụng 01 cặp mồi xuôi/ngược, các gen sử dụng số cặp mồi xuôi/ngược tương ứng. Mỗi phản ứng PCR có thể thực hiện đơn mồi hoặc đa mồi.

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	60 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

Lưu ý: mỗi cặp mồi xuôi/ngược có nhiệt độ bắt cặp khác nhau.

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %

- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20µL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gene liên quan đến kháng thuốc của *Neisseria gonorrhoeae* thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là gen có mức tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$ thì kiểm tra tỷ lệ các gen, nếu gen nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận gen tương đồng với gen đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có gen nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide gen kháng thuốc của *Neisseria gonorrhoeae* phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

156. *Chlamydia* giải trình tự gen

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của vi khuẩn *Chlamydia* trong bệnh phẩm bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng kỹ thuật sequencing để xác định trình tự nucleotide gen đặc trưng của vi khuẩn *Chlamydia*, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để định danh *Chlamydia*.

Định nghĩa:

- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi khuẩn đã được nuôi cấy thuần hoặc bệnh phẩm chỉ chứa 1 căn nguyên vi khuẩn duy nhất
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng vi khuẩn Chlamydia chuẩn hoặc chủng vi khuẩn Chlamydia đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	57 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.

- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μ l sản phẩm PCR + 1.5 μ l Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μ l)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20 μ L sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gene đặc trưng của Chlamydia thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là chủng Chlamydia tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$ thì kiểm tra tỷ lệ các chủng Chlamydia, nếu chủng nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận tương đồng với chủng Chlamydia đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có chủng Chlamydia nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide gen đặc trưng của *Chlamydia* phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

157. *Helicobacter pylori* giải trình tự gen

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong bệnh phẩm bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng kỹ thuật sequencing để xác định trình tự nucleotide gen đặc trưng của vi khuẩn *Helicobacter pylori*, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để định danh *Helicobacter pylori*.

Định nghĩa

- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi khuẩn đã được nuôi cấy thuần hoặc bệnh phẩm chỉ chứa 1 căn nguyên vi khuẩn duy nhất
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng vi khuẩn *Helicobacter pylori* chuẩn hoặc chủng vi khuẩn *Helicobacter pylori* đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	57 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.

- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μ l sản phẩm PCR + 1.5 μ l Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μ l)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20 μ L sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gene đặc trưng của *Helicobacter pylori* thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là chủng *Helicobacter pylori* tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$ thì kiểm tra tỷ lệ các chủng *Helicobacter pylori*, nếu chủng nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận tương đồng với chủng *Helicobacter pylori* đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có chủng *Helicobacter pylori* nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide gen đặc trưng của *Helicobacter pylori* phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

158. Virus giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Định danh căn nguyên virus từ mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng kỹ thuật sequencing để xác định trình tự nucleotide gen đặc trưng của virus, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để định danh virus.

Định nghĩa

- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN/ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2,5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết tương, huyết thanh, máu toàn phần, nước tiểu, dịch cơ thể, mô sinh thiết (kích thước tối thiểu 1 x 1 x 1 mm)
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN/ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng virus chuẩn hoặc chủng virus đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công
- Sử dụng bộ sinh phẩm tách chiết cho cả ADN/ARN

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN/ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Nếu là virus ARN thì dùng bộ sinh phẩm RT-PCR, nếu là virus ADN thì dùng bộ sinh phẩm giống như dùng cho vi khuẩn.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase/RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix cho virus ADN và OneStep RT-PCR Master Mix cho virus ARN	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	AND/ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết ADN/ARN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN/ARN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:
- Chu trình nhiệt dùng cho virus ADN:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

- Chu trình nhiệt dùng cho virus ARN:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	55 °C	30 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
3	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
4	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
5	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20µL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gen đặc trưng của virus thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là chủng virus tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$ thì kiểm tra tỷ lệ các chủng virus, nếu chủng nào chiếm tỷ lệ cao ($> 2/3$) thì có thể kết luận mẫu tương đồng với chủng đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có chủng virus nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN/ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide gen đặc trưng của virus phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

159. HBV genotype giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các kiểu gen (genotype) của Hepatitis B virus (HBV) bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng kỹ thuật sequencing để xác định trình tự nucleotide vùng gen S của HBV, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu gene để xác định genotype của HBV.

Định nghĩa:

- + HBV (Hepatitis B Virus): Vi-rút viêm gan B
- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2,5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh, máu toàn phần, máu đông khô, các dịch cơ thể, mảnh sinh thiết (kích thước tối thiểu 1 x 1 x 1 mm).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HBV chuẩn hoặc mẫu HBV dương tính đã được xác định genotype. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	55 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.

- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μ l sản phẩm PCR + 1.5 μ l Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μ l)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20 μ L sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gen S của HBV thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là HBV genotype tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$ thì kiểm tra tỷ lệ các chủng HBV, nếu chủng HBV nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận tương đồng với chủng HBV đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có chủng HBV nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide gen S của HBV phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

160. HBV kháng thuốc giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các đột biến gen của Hepatitis B virus (HBV) liên quan đến kháng thuốc dùng trong điều trị bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng kỹ thuật sequencing để xác định trình tự nucleotide vùng gen RT của HBV, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu HBV Drug Resistance database để xác định các đột biến của HBV có liên quan đến các thuốc điều trị.

Định nghĩa

- + HBV (Hepatitis B Virus): Vi-rút viêm gan B
- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2,5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh, máu toàn phần, máu đông khô, các dịch cơ thể, mảnh sinh thiết (kích thước tối thiểu 1 x 1 x 1 mm).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HBV chuẩn hoặc mẫu HBV dương tính đã được xác định genotype. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:
- Thành phần phản ứng PCR vòng 1:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi vòng 1	1.0
4	Mồi ngược vòng 1	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Thành phần phản ứng PCR vòng 2:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi vòng 2	1.0
4	Mồi ngược vòng 2	1.0
5	H ₂ O	20.0
6	Sản phẩm PCR vòng 1	2.0
7	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

PCR vòng 1:

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

Chu trình nhiệt của PCR vòng 1:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	30 chu kỳ
	59 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

Chu trình nhiệt của PCR vòng 2:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	55 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR vòng 2 + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20μL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự.
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gen RT của HBV thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu HBV Drug Resistance Database.
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Kết quả so sánh hiển thị không có đột biến hoặc có các đột biến liên quan đến kháng một số loại thuốc đang dùng trong điều trị HBV.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Cần có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm

- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

161. Virus kháng thuốc giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các đột biến gen của virus liên quan đến kháng thuốc dùng trong điều trị bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng kỹ thuật sequencing để xác định trình tự nucleotide vùng gen đặc trưng của virus, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu Virus Drug Resistance database để xác định các đột biến của virus có liên quan đến các thuốc điều trị.

Định nghĩa

- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C

- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh, máu toàn phần, máu đông khô, các dịch cơ thể, mảnh sinh thiết (kích thước tối thiểu 1 x 1 x1 mm).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HBV chuẩn hoặc mẫu HBV dương tính đã được xác định genotype. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết

ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:
- Thành phần phản ứng PCR vòng 1:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi vòng 1	1.0
4	Mồi ngược vòng 1	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Thành phần phản ứng PCR vòng 2:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi vòng 2	1.0
4	Mồi ngược vòng 2	1.0
5	H ₂ O	20.0
6	Sản phẩm PCR vòng 1	2.0
7	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

PCR vòng 1:

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

Chu trình nhiệt của PCR vòng 1:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	30 chu kỳ
	59 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

Chu trình nhiệt của PCR vòng 2:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	55 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60°C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR vòng 2 + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20μL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự.
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gen đặc trưng của virus thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu Virus Drug Resistance Database.
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Kết quả so sánh hiển thị không có đột biến hoặc có các đột biến liên quan đến kháng một số loại thuốc đang dùng trong điều trị kháng virus.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Cần có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm

- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

162. HCV genotype giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các kiểu gen (genotype) của Hepatitis C virus (HCV) bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng kỹ thuật sequencing để xác định trình tự nucleotide vùng gen NS5B (Core) của HCV, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định genotype của HCV.

Định nghĩa

- + HCV (Hepatitis C Virus): Vi-rút viêm gan C
- + ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- + RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2,5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh, máu toàn phần, máu đông khô, các dịch cơ thể, mảnh sinh thiết (kích thước tối thiểu 1 x 1 x 1 mm).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HCV chuẩn hoặc mẫu HCV dương tính đã được xác định genotype. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng RT-PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit OneStep RT-PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:
- Thành phần phản ứng RT-PCR (vòng 1):

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	Mồi xuôi	1.0
3	Mồi ngược	1.0
4	H ₂ O	12.0
5	ARN khuôn	10.0
6	Tổng thể tích	50

- Thành phần phản ứng Nested PCR (vòng 2):

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂	1
3	Mồi xuôi	1
4	Mồi ngược	1
5	H ₂ O	20
6	ADN khuôn (PCR vòng 1)	2
7	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

PCR vòng 1:

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết ARN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ARN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	50 °C	30 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
3	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	60 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
4	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
5	4 °C	Bảo quản	

PCR vòng 2:

- Chuyển 2 µl sản phẩm PCR vòng 1 cùng các chứng âm, chứng dương vào các ống PCR chứa Master mix vòng 2 tương ứng
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm PCR vòng 1.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20μL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide vùng NS5B (Core) của HCV thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là HCV genotype tương đồng cao.

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$ thì kiểm tra tỷ lệ các chủng HCV, nếu chủng HCV nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận tương đồng với chủng HCV đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có chủng HCV nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật**

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide vùng NS5B (Core) của HCV phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.

- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

163. HIV kháng thuốc giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các đột biến gen của Human Immunodeficiency Virus (HIV) liên quan đến kháng thuốc dùng trong điều trị bằng phương pháp giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng phương pháp sequencing để xác định trình tự nucleotide vùng gen Reverse Transcriptase (RT), Protease (PR) và Integrase (IN) của HIV, so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu HBV Drug Resistance Database để xác định các đột biến của HIV có liên quan đến các thuốc điều trị.

Định nghĩa

- + HIV (Human Immunodeficiency Virus): Vi-rút gây suy giảm miễn dịch ở người
- + ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- + RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh, máu toàn phần, máu đông khô, các dịch cơ thể, mảnh sinh thiết (kích thước tối thiểu 1 x 1 x1 mm).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HIV chuẩn hoặc mẫu HIV dương tính đã được xác định. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:
- Thành phần phản ứng PCR vòng 1:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mỗi xuôi vòng 1 (gen RT, PR, IN)	1.0
4	Mỗi ngược vòng 1 (gen RT, PR, IN)	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Thành phần phản ứng PCR vòng 2:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mỗi xuôi vòng 2 (gen RT, PR, IN)	1.0
4	Mỗi ngược vòng 2 (gen RT, PR, IN)	1.0
5	H ₂ O	20.0
6	Sản phẩm PCR vòng 1	2.0
7	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

PCR vòng 1:

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết ARN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ARN tách chiết.

- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

Chu trình nhiệt của PCR vòng 1:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	55 °C	30 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	2 phút	1 chu kỳ
3	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	59 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
4	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
	4 °C	Bảo quản	

Lưu ý: Nhiệt độ bắt cặp của cặp mồi đặc hiệu cho gen RT, PR, IN khác nhau.

Chu trình nhiệt của PCR vòng 2:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	60 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

Lưu ý: Nhiệt độ bắt cặp của cặp mồi đặc hiệu cho gen RT, PR, IN khác nhau

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR vòng 2 + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Môi (gen RT, PR)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	Phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20μL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gen RT, PR, IN của HIV thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu HIV Drug Resistance Database
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Kết quả so sánh hiển thị không có đột biến hoặc có các đột biến liên quan đến kháng một số loại thuốc đang dùng trong điều trị HIV

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Cần có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm

- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

164. HIV genotype giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định kiểu gene (genotype) của Human Immunodeficiency Virus (HIV) bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng kỹ thuật sequencing để xác định trình tự nucleotide đoạn gen đặc trưng của HIV, sau đó so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định kiểu gen tương đồng của HIV.

Định nghĩa

- + HIV (Human Immunodeficiency Virus): Vi-rút gây suy giảm miễn dịch ở người
- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%

- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN

- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết tương, huyết thanh hoặc máu toàn phần
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN của HIV

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HIV chuẩn hoặc mẫu HIV đã xác định genotype, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

- Thành phần phản ứng RT-PCR (vòng 1):

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	RT-PCR Master Mix	25.0
2	Mồi xuôi	1.0
3	Mồi ngược	1.0
4	H ₂ O	12.0
5	ARN khuôn	10.0
6	Tổng thể tích	50

- Thành phần phản ứng Nested PCR (vòng 2):

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂	1
3	Mồi xuôi	1
4	Mồi ngược	1
5	H ₂ O	20
6	ADN khuôn (PCR vòng 1)	2
7	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

PCR vòng 1:

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết ARN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ARN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	55 °C	30 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
3	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	55 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
4	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
5	4 °C	Bảo quản	

PCR vòng 2:

- Chuyển 2 µl sản phẩm PCR vòng 1 cùng các chứng âm, chứng dương vào các ống PCR chứa Master mix vòng 2 tương ứng
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm PCR vòng 1.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	4 phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc.

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20μL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự nucleotide gen đặc trưng của HIV thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen HIV Genotype Database.
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.

- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là HIV genotype tương đồng cao.
- Chú ý:
- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$, thì kiểm tra tỷ lệ các HIV genotype, nếu genotype nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận mẫu tương đồng với genotype đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có genotype nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

165. EV71 genotype giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định kiểu gen (genotype) của chủng Enterovirus 71 (EV71) bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.1. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của EV71 được sao chép ngược bằng phản ứng RT-PCR, sau đó nhân dòng bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và giải trình tự nucleotide bằng kỹ thuật sequencing, sau đó so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định kiểu gen tương đồng của EV71

Định nghĩa

- + EV71: Enterovirus 71
- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh

- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt

- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: dịch nốt phỏng, dịch cơ thể
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu EV71 chuẩn hoặc mẫu EV đã được xác định genotype, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.

- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng RT-PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit OneStep RT-PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.

- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	55 °C	15 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
3	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	55 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
4	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
5	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	4 phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20µL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự.

- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự của mẫu thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là EV71 genotype tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$, thì kiểm tra tỷ lệ các EV71 genotype, nếu genotype nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận mẫu tương đồng với genotype đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có genotype nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

166. Enterovirus genotype giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định kiểu gen (genotype) của Enterovirus (EV) bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của EV được sao chép ngược bằng phản ứng RT-PCR, sau đó nhân dòng bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và giải trình tự nucleotide bằng kỹ thuật sequencing, sau đó so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định kiểu gen tương đồng của EV.

Định nghĩa

- + EV: Enterovirus
- + ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- + ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- + PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- + RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- + Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- + An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%

- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN

- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết tương, huyết thanh, dịch nốt phỏng, dịch cơ thể
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu EV chuẩn hoặc mẫu EV đã được xác định, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng RT-PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Onstep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	55 °C	15 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
3	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	56 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
4	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
5	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	4 phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc.

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20µL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự.
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự của mẫu EV thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là EV genotype tương đồng cao.

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$, thì kiểm tra tỷ lệ các EV genotype, nếu genotype nào chiếm tỷ lệ cao ($> 2/3$) thì có thể kết luận mẫu tương đồng với chủng đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có EV genotype nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

167. HPV genotype giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự kiểu gen (genotype) của Human Papilloma Virus (HPV) bằng kỹ thuật và giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của HPV được nhân dòng bằng kỹ thuật PCR, sau đó sử dụng kỹ thuật sequencing để xác định trình tự nucleotide của đoạn ADN đặc trưng đó. Trình tự nucleotide sau đó được so sánh trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định kiểu gen HPV tương đồng.

Định nghĩa

- HPV: Human Papilloma Virus
- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2,5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch phết cổ tử cung, dịch cơ thể khác
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 24 giờ (1 ngày)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HPV chuẩn hoặc mẫu HPV đã được xác định genotype, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết

ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng RT-PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết DNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	55 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	10 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.

- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μ l sản phẩm PCR + 1.5 μ l Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μ l)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	4 phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20 μ L sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự.
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự của mẫu thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là kiểu gen HPV tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$, thì kiểm tra tỷ lệ các kiểu gen, nếu kiểu gen nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận mẫu tương đồng với kiểu gen đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có kiểu gen nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì

khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả qua trình tách chiết, pha mix và PCR.

- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

168. *Influenza virus A, B* giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của virus cúm A, B trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân bằng kỹ thuật trình tự nucleotide (sequencing)

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của virus cúm A, B được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR và nhân dòng bằng kỹ thuật PCR. Trình tự nucleotide được xác định bằng kỹ thuật sequencing, trình tự nucleotide này sau đó so sánh trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định kiểu gen tương đồng của virus cúm A, B.

Định nghĩa:

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay

- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR

- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: các dịch hô hấp bao gồm dịch ngoáy họng, dịch tỵ hầu, dịch rửa phế quản
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): Dịch ngoáy họng, dịch tỵ hầu được đựng trong môi trường vận chuyển virus, dịch rửa phế quản được đựng trong lọ nhựa có nắp đậy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu virus cúm A, B chuẩn hoặc mẫu virus cúm A, B đã xác định, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.

- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit PCR và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.

- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần phản ứng RT-PCR	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi (A, B)	1.0
4	Mồi ngược (A, B)	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	55 °C	30 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	2 phút	1 chu kỳ
3	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	55 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
4	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
5	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %

- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	4 phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20µL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự.
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự của mẫu thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là kiểu gen virus cúm A, B tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$, thì kiểm tra tỷ lệ các kiểu gen, nếu kiểu gen nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận mẫu tương đồng với kiểu gen đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có kiểu gen nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả qua trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

169. Rubella virus giải trình tự gene

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của virus Rubella trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của virus Rubella được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR và nhân dòng bằng kỹ thuật PCR. Trình tự nucleotide được xác định bằng kỹ thuật sequencing, trình tự nucleotide này sau đó so sánh trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định chủng virus Rubella tương đồng.

Định nghĩa

- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết tương, huyết thanh, dịch cơ thể
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu Rubella chuẩn hoặc mẫu Rubella đã được xác định, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết

ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết ARN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ARN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	55 °C	30 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
3	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	57 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
4	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
5	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.

- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μ l sản phẩm PCR + 1.5 μ l Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μ l)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	4 phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20 μ L sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự.
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự của mẫu thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là chủng Rubella tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$, thì kiểm tra tỷ lệ các chủng Rubella, nếu chủng nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận mẫu tương đồng với chủng đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có chủng nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì

khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả qua trình tách chiết, pha mix và PCR.

- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

170. Ký sinh trùng xác định trình tự một đoạn gen

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định trình tự nucleotide một đoạn gen của ký sinh trùng bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn gen của ký sinh trùng được nhân dòng bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Trình tự nucleotide của đoạn gen này được xác định bằng kỹ thuật sequencing, sau đó so sánh trình tự này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định mức độ tương đồng nucleotide.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2,5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Các mẫu bệnh phẩm cần xác định ký sinh trùng (máu, dịch não tủy, phân, đờm, dịch rửa phế quản...)
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 24 giờ (1 ngày)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu ký sinh trùng chuẩn hoặc mẫu ký sinh trùng đã được định danh, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết DNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	59 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.

- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μ l sản phẩm PCR + 1.5 μ l Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme.

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μ l)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	4 phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc.

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20 μ L sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự của mẫu thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.
- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là mức tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$, thì kiểm tra tỷ lệ các gen, nếu gen nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận mẫu tương đồng với gen đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có gen nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì

khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả qua trình tách chiết, pha mix và PCR.

- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

171. Vi khuẩn kháng thuốc PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các gen liên quan đến kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Sử dụng cặp mồi có trình tự đặc hiệu để nhân đoạn ADN đặc trưng của gen liên quan đến kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh bằng kỹ thuật PCR. Sự có mặt của gen kháng thuốc được xác định thông qua so sánh kích thước của sản phẩm PCR với thang ADN chuẩn trên gel agarose điện di.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi khuẩn đã được nuôi cấy thuần hoặc mẫu bệnh phẩm là máu, dịch não tủy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu vi khuẩn chuẩn hoặc mẫu vi khuẩn đã được định danh trước đó, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

Lưu ý: Mỗi một gen liên quan đến kháng thuốc sử dụng một cặp môi xuôi/ngược. số cặp môi xuôi/ngược được sử dụng tương ứng với số gen liên quan đến kháng thuốc cần xác định. Có thể thực hiện PCR đơn hoặc PCR đa môi.

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết DNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	55 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

Lưu ý: Mỗi một cặp môi xuôi/ngược. số cặp môi xuôi/ngược có một nhiệt độ bắt cặp tối ưu, cần lưu ý nhiệt độ bắt cặp tối ưu khi sử dụng PCR đa môi.

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

172. Vi khuẩn kháng thuốc real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Để phát hiện DNA của vi khuẩn kháng kháng sinh glycopeptide và betalactam (IMP, TBM4, OXA-51-LIKE, CTX-M-1, TEM, VAN A/B, MEC A, OXA-48-LIKE, OXA-40-LIKE, VIM, KPC, OXA-23-LIKE, NDM, SHV, GES) trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm dựa trên công nghệ phát hiện đa đích và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm:
 - + Đờm: lấy ít nhất 1 ml đờm vào lọ vô trùng.
 - + Nước tiểu: Lấy nước tiểu đầu vào buổi sáng sau khi ngủ dậy, lấy khoảng 20 ml – 30 ml vào lọ vô trùng.
 - + Tăm bông
 - + Bệnh phẩm cạo từ đường hô hấp, đường tiêu hóa, sinh dục tiết niệu.

- + Dịch hút, dịch tiết.
- + Nuôi cấy vi khuẩn thu được bằng cách cấy mẫu bệnh phẩm lâm sàng trong môi trường canh thang hoặc môi trường thạch.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Trước khi tách chiết cho 10 µl chứng nội (IC) vào từng giếng nhỏ bệnh phẩm. Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chuẩn bị ống Master Mix với tỷ lệ các thành phần như dưới đây:

Thành phần	Cho 1 phản ứng	Cho n phản ứng
PCR-Reaction Mix - 1 (20 µl/ống)	1 thanh 8 ống	1 x n
Taq Polymerase	10 µl	10 x n

- Đảo trộn ống nhẹ nhàng khoảng 5 lần hoặc vortex sau đó ly tâm spindown.

- Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 5 μ l DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 5 μ l chứng dương và 5 μ l chứng âm. Thể tích cuối cùng là 25 μ l.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.
- Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2 Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

173. Carbapenemase test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm sắc ký miễn dịch xác định 5 loại enzym carbapenemase phổ biến là KPC, OXA-48, VIM, IMP và NDM do vi khuẩn thuộc *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* tiết ra để phá hủy kháng sinh nhóm Carbapenem từ khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý bắt cặp đặc hiệu kháng nguyên – kháng thể của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.
- Vi khuẩn được hòa tan vào dung dịch đệm để giải phóng các enzyme carbapenemase (nếu có) khỏi tế bào. Enzym sẽ kết hợp với kháng thể đơn dòng đặc hiệu gắn trên màng nitrocellulose và kết hợp với cộng hợp vàng tạo phức hợp kháng nguyên – kháng thể. Phức hợp hiển thị bằng vạch màu đỏ trên vùng tương ứng của dải giấy.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Sinh phẩm xác định enzym carbapenemase bao gồm: Khay thử nghiệm được bảo quản trong túi kín, có gói chất chống ẩm, Dung dịch hòa tan mẫu chứa trong lọ có đầu nhỏ giọt
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Còn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch nước rửa tay
- Ống Eppendorf 1ml để chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn
- Pipette vô trùng chia vạch 100µl
- Ống cây nhựa vô trùng 10µl
- Tiêu hao vật tư cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Giá để ống Eppendorf
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học để thực hiện kỹ thuật
- Máy vortex để trộn mẫu tạo huyền dịch đồng nhất
- Đồng hồ tính phút (đồng hồ bấm giây)
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Khuẩn lạc của vi khuẩn thuộc Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* được phân lập từ các loại mẫu bệnh phẩm của cơ thể người bệnh như máu, dịch não tủy, dịch ổ bụng, dịch vết thương, phân, nước tiểu...
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:

Khuẩn lạc thuần 18 - 24 giờ tuổi trên môi trường nuôi cấy được khuyến cáo theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm như môi trường dinh dưỡng không chọn lọc, môi trường sử dụng để thử nghiệm kháng sinh, môi trường tạo màu sàng lọc kháng carbapenem.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm Vi sinh/Phòng xét nghiệm Vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước	Nội dung
1	Nhỏ thể tích dung dịch hòa tan mẫu theo quy định của nhà sản xuất vào ống Eppendorf, đặt ống lên giá.
2	Sử dụng que cấy vô trùng, chạm đầu que cấy vào vài khuẩn lạc thuần và nghiền nhẹ nhàng vào ống chứa dung dịch hòa tan mẫu để tạo thành huyền dịch.

Các bước	Nội dung
3	Trộn đều ống huyền dịch bằng máy vortex và ủ ở khoảng nhiệt độ, thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Lấy khay thử nghiệm ra khỏi túi bảo quản ngay sau khi đủ thời gian xử lý mẫu bệnh phẩm
5	Ghi thông tin mẫu lên phần quy định của khay thử
6	Sử dụng pippett nhựa vô trùng hút thể tích huyền dịch theo quy định nhỏ vào vị trí cho mẫu trên khay thử
7	Đọc kết quả xét nghiệm trong khoảng thời gian quy định của nhà sản xuất.
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả vạch chứng

- Kết quả của kỹ thuật thực hiện được chấp nhận khi xuất hiện vạch tại vị trí C trên khay thử.

4.2.2 Đọc kết quả và nhận định kết quả

- Chỉ có vạch xuất hiện tại vị trí C trên khay thử: **không có enzyme carbapenemase**
- Có vạch xuất hiện tại vị trí C và một/hoặc nhiều vạch tại vùng thử có kí hiệu tương ứng với từng loại enzym K (KPC); O(OXA-48); V(VIM); I(IMP); N(NDM): **có enzyme carbapenemase** (loại enzyme tương ứng vạch trên khay thử)
- Không có vạch xuất hiện tại vị trí C: xét nghiệm không có giá trị, tiến hành thực hiện lại với khay thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ của đơn vị

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	- Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước theo quy trình hướng dẫn. - Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả trong các trường hợp sau: + Vi khuẩn được cấy chuyển nhiều lần mà không đúng điều kiện phù hợp	- Thực hiện đúng các bước theo quy trình hướng dẫn. - Vi khuẩn không nên cấy chuyển nhiều lần - Không nên sử dụng khuẩn lạc vi khuẩn <i>Proteus mirabilis</i> trên môi trường Thạch

SAI SÓT	XỬ TRÍ
+ Khi thử nghiệm với vi khuẩn <i>Proteus mirabilis</i> trên môi trường Thạch máu + Lấy không đủ lượng vi khuẩn theo khuyến cáo - Kết quả dương tính giả có thể xảy ra khi đọc kết quả quá thời gian quy định - Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. - Không ủ đúng thời gian quy định - Khay thử lấy ra khỏi túi bảo quản quá thời gian quy định dẫn đến khay thử bị ẩm, kết quả có thể bị sai lệch	máu. Trong trường hợp bắt buộc thì tuân thủ đúng quy định dùng que cấy chạp 3 vị trí khác nhau của khuẩn lạc trên môi trường để thực hiện thử nghiệm. - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (nhiệt độ bảo quản, thời gian bảo quản...) - Ủ và đọc kết quả đúng thời gian quy định
- Phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

174. Enzym MCR kháng Colistin test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm sắc ký miễn dịch phát hiện enzym MCR-1 do Trục khuẩn Gram âm tiết ra để phân hủy Polymyxin E (Colistin) từ khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý bắt cặp đặc hiệu kháng nguyên – kháng thể của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.
- Vi khuẩn được hòa tan vào dung dịch đệm để giải phóng enzyme MCR-1 (nếu có) khỏi tế bào. Enzym sẽ kết hợp với kháng thể đơn dòng đặc hiệu gắn trên màng nitrocellulose và kết hợp với cộng hợp vàng tạo phức hợp kháng nguyên – kháng thể. Phức hợp hiển thị bằng vạch màu đặc trưng trên vùng tương ứng của dải giấy.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Sinh phẩm xác định enzym MCR-1 bao gồm: Khay thử nghiệm được bảo quản trong túi kín, có gói chất chống ẩm, Dung dịch hòa tan mẫu chứa trong lọ có đầu nhỏ giọt
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch nước rửa tay
- Ống Eppendorf 1ml để chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn
- Pipette vô trùng chia vạch 100µl
- Ống cấy nhựa vô trùng 10µl
- Tiêu hao vật tư cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Giá để ống Eppendorf
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học để thực hiện kỹ thuật
- Máy vortex để trộn mẫu tạo huyền dịch đồng nhất
- Đồng hồ tính phút (đồng hồ bấm giây)
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Khuẩn lạc của trực khuẩn Gram âm được phân lập từ các loại mẫu bệnh phẩm của cơ thể người bệnh như máu, dịch não tủy, dịch ổ bụng, dịch vết thương, phân, nước tiểu...
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Khuẩn lạc thuần 18 - 24 giờ tuổi trên môi trường nuôi cấy được khuyến cáo theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm như môi trường dinh dưỡng không chọn lọc, môi trường sử dụng để thử nghiệm kháng sinh, môi trường tạo màu sàng lọc kháng Colistin.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm Vi sinh/ Phòng xét nghiệm Vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước	Nội dung
1	Nhỏ 5 giọt (150µl) dung dịch đệm vào ống Eppendorf, đặt ống lên giá.
2	Sử dụng que cấy vô trùng, chạm đầu que cấy vào 3 khuẩn lạc thuần và nghiền nhẹ nhàng vào ống chứa dung dịch hòa tan mẫu để tạo thành huyền dịch.

Các bước	Nội dung
3	Trộn đều ống huyền dịch bằng máy vortex và ủ ở khoảng nhiệt độ, thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Lấy khay thử nghiệm ra khỏi túi bảo quản ngay sau khi đủ thời gian xử lý mẫu bệnh phẩm
5	Ghi thông tin mẫu lên phần quy định của khay thử
6	Sử dụng pipett nhựa vô trùng được cung cấp sẵn trong hộp sinh phẩm, hút lượng thể tích huyền dịch nhỏ vào vị trí quy định cho mẫu trên khay thử theo hướng dẫn của nhà sản xuất
7	Đọc kết quả thử nghiệm trong khoảng thời gian quy định của nhà sản xuất.
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả vạch chứng

Kết quả của kỹ thuật thực hiện được chấp nhận khi xuất hiện vạch tại vị trí C trên khay thử.

4.2.2 Đọc kết quả và nhận định kết quả

- Chỉ có vạch xuất hiện tại vị trí C trên khay thử: Không có Enzyme MCR-1 kháng Colistin
- Có vạch xuất hiện tại vị trí C và T trên khay thử: Có Enzyme MCR-1 kháng Colistin
- Không có vạch phản ứng xuất hiện tại các vị trí C của khay thử: xét nghiệm không có giá trị, tiến hành thực hiện lại với khay thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ của đơn vị

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	- Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả trong các trường hợp vi khuẩn được cấy	- Tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản

SAI SÓT	XỬ TRÍ
chuyển nhiều lần mà không đúng điều kiện phù hợp, lấy không đủ lượng khuẩn lạc như khuyến cáo. - Kết quả dương tính giả có thể xảy ra khi đọc kết quả quá thời gian quy định - Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. - Không ủ đúng thời gian quy định - Khay thử lấy ra khỏi túi bảo quản quá thời gian quy định dẫn đến khay thử bị ẩm, kết quả có thể bị sai lệch	xuất (nhiệt độ bảo quản, thời gian bảo quản...)
- Nhận định, phiên giải và biện luận kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

175. ESBLs test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm sắc ký miễn dịch phát hiện 5 nhóm enzym chính là CTX –M 1, 2, 8, 9 và 25 của enzym β - lactamase phổ rộng (ESBLs) do vi khuẩn thuộc *Enterobacterales* tiết ra để phá hủy hầu hết các kháng sinh chứa vòng β - lactam từ khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy .

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý bắt cặp đặc hiệu kháng nguyên – kháng thể của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.
- Vi khuẩn được hòa tan vào dung dịch đệm để giải phóng enzyme CTX – M 1, 2, 8, 9 và 25 (nếu có) khỏi tế bào. Enzym sẽ kết hợp với kháng thể đơn dòng đặc hiệu gắn trên màng nitrocellulose và kết hợp với cộng hợp vàng tạo phức hợp kháng nguyên – kháng thể. Phức hợp hiển thị bằng vạch màu đặc trưng trên vùng tương ứng của dải giấy.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Sinh phẩm xác định enzym ESBLs bao gồm: Khay thử nghiệm được bảo quản trong túi kín, có gói chất chống ẩm, Dung dịch hòa tan mẫu chứa trong lọ có đầu nhỏ giọt
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch nước rửa tay
- Ống Eppendorf 1ml để chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn
- Pipette vô trùng chia vạch 100 μ l
- Ống cấy nhựa vô trùng 10 μ l
- Tiêu hao vật tư cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Giá để ống Eppendorf
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học để thực hiện kỹ thuật
- Máy vortex để trộn mẫu tạo huyền dịch đồng nhất
- Đồng hồ tính phút (đồng hồ bấm giây)
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Khuẩn lạc của trực khuẩn Gram âm được phân lập từ các loại mẫu bệnh phẩm của cơ thể người bệnh như máu, dịch não tủy, dịch ổ bụng, dịch vết thương, phân, nước tiểu...
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Khuẩn lạc thuần 18 - 24 giờ tuổi trên môi trường nuôi cấy được khuyến cáo theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm như môi trường dinh dưỡng không chọn lọc, môi trường sử dụng để thử nghiệm kháng sinh...

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm Vi sinh/ Phòng xét nghiệm Vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước	Nội dung
1	Nhỏ thể tích dung dịch hòa tan mẫu theo quy định của nhà sản xuất vào ống Eppendorf, đặt ống lên giá.

Các bước	Nội dung
2	Sử dụng que cấy vô trùng, chạm đầu que cấy vào vài khuẩn lạc thuần và nghiền nhẹ nhàng vào ống chứa dung dịch hòa tan mẫu để tạo thành huyền dịch.
3	Trộn đều ống huyền dịch bằng máy vortex và ủ ở khoảng nhiệt độ, thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Lấy khay thử nghiệm ra khỏi túi bảo quản ngay sau khi đủ thời gian xử lý mẫu bệnh phẩm
5	Ghi thông tin mẫu lên phần quy định của khay thử
6	Sử dụng pippett nhựa vô trùng hút thể tích huyền dịch theo quy định nhỏ vào vị trí cho mẫu trên khay thử
7	Đọc kết quả xét nghiệm trong khoảng thời gian quy định của nhà sản xuất.
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả vạch chứng

Kết quả của kỹ thuật thực hiện được chấp nhận khi xuất hiện vạch tại vị trí C trên khay thử.

4.2.2 Đọc kết quả và nhận định kết quả

- Chỉ có vạch xuất hiện tại vị trí C trên khay thử: Không có Enzyme ESBLs
- Có vạch xuất hiện tại vị trí C và T trên khay thử: Có Enzyme ESBLs
- Không có vạch phản ứng xuất hiện tại vị trí C của khay thử: xét nghiệm không có giá trị, tiến hành thực hiện lại với khay thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ của đơn vị

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	- Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.	- Tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả trong các trường hợp vi khuẩn được cấy chuyển nhiều lần mà không đúng điều kiện phù hợp, lấy không đủ lượng khuẩn lạc như khuyến cáo. - Kết quả dương tính giả có thể xảy ra khi đọc kết quả quá thời gian quy định - Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. - Không ủ đúng thời gian quy định - Khay thử lấy ra khỏi túi bảo quản quá thời gian quy định dẫn đến khay thử bị ẩm, kết quả có thể bị sai lệch	- Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (nhiệt độ bảo quản, thời gian bảo quản...)
- Nhận định, phiên giải và biện luận kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

176. Vi sinh vật nhiễm khuẩn huyết Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện được trực tiếp từ máu toàn phần của người các loài vi khuẩn *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, và *Staphylococcus aureus*, một số loài nấm *Candida* sau: *Candida albicans* (CA), *Candida tropicalis* (CPT), *Candida krusei* (CK), *Candida glabrata* (CG), *Candida parapsilosis* (CP) bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, Nguyên lý

Dựa trên việc phát hiện DNA trực tiếp từ máu toàn phần bằng hệ thống tự động. Cartridge chứa tất cả các chất dùng một lần và thuốc thử cần thiết để phát hiện nhiều mầm bệnh trong máu hoàn toàn tự động.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml

- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm loại để bàn
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Máy T2Dx, barcode scanner và hệ thống máy vi tính.
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chất chống đông EDTA.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Lấy Cartridge ra khỏi bao bì riêng lẻ, kiểm tra nhãn và mã vạch xem có nguyên vẹn không, và đặt lên bề mặt lắp ráp. Bỏ bao bì.
- Lấy Sample Inlet(s) ra khỏi bao bì, kiểm tra nhãn xem có nguyên vẹn không và cẩn thận đặt lên bề mặt làm việc của cụm Panel, cẩn thận để tránh chạm vào phần giấy bạc trên Sample Inlet và Reagent Tray.
- Lấy Reagent Tray ra khỏi bao bì, kiểm tra nhãn và mã vạch xem có nguyên vẹn không, và đặt lên bề mặt lắp ráp. Bỏ bao bì.
- Trộn thuốc thử trong Reagent Tray bằng máy vortex: Đặt tốc độ vortex thành 2560-3200 rpm.
 - o Giữ chắc chắn Reagent Tray thẳng đứng với mã vạch hướng lên trên. Lưu ý không chạm vào phần giấy bạc trên thân
 - o Đặt Reagent Tray vào giữa phần đính kèm nắp đầu xoay 3 inch.
 - o Giữ các mạc của Reagent Tray và nhấn xuống để kích hoạt máy vortex.

- Vortex khay thuốc thử trong 5 giây và sau đó kiểm tra bằng mắt các giếng xem có sự đồng nhất. Nếu không đồng nhất, hãy lặp lại xoáy tối đa hai lần cho đến khi nhìn thấy các giếng đồng nhất.
- Việc trộn thuốc thử có thể dẫn đến bắn thuốc thử lên thành giếng của khay thuốc thử và/hoặc hình thành bong bóng trong giếng. Nếu cần, có thể lắc khay để loại bỏ bọt khí và thu dung dịch ở đáy giếng để bọt khí được loại bỏ.
- Chuẩn bị lắp Reagent Tray vào Cartridge bằng cách định hướng Reagent tray sao cho mấu trên nắp Reagent Tray nằm ở bên phải và các rãnh trên Reagent Tray và Cartridge thẳng hàng.
- Đặt Reagent Tray lên Cartridge sao cho Reagent Tray nằm trên Cartridge. Đẩy xuống phía bên trái của nắp Reagent Tray để khớp với mấu bên trái. Sau đó ấn xuống phía bên phải của nắp Reagent Tray để khớp với mấu bên phải.
- Lấy một mẫu. Đảm bảo rằng mẫu ở nhiệt độ phòng. Tái huyền phù bằng cách đảo ngược ống lấy máu 8-10 lần. Không sử dụng mẫu nếu nhìn bằng mắt thường hỗn hợp không đồng nhất sau khi huyền phù lại.
- Mở nắp ống máu. Đảo ngược và đặt Sample Inlet bên trong ống lấy máu. Đảo trộn Sample Inlet và ống lấy máu rồi đặt vào bề mặt làm việc. Làm tương tự với các mẫu tiếp theo
- Đảm bảo rằng mức mẫu trong mỗi ống lấy máu giảm xuống khi máu chuyển từ (các) ống lấy mẫu sang các giếng Sample Inlet. Nếu mức Mẫu không giảm sau một phút, hãy gõ nhẹ mô-đun đầu vào mẫu vào mặt bàn vài lần để mẫu chảy vào các giếng Sample Inlet.
- Giữ các mặt sau của cụm Sample Inlet cẩn thận để tránh tiếp xúc với phần giấy bạc và đẩy vào Cartridge cho đến khi nghe thấy tiếng tách. Thiết lập đầu vào hoàn thiện, lặp lại với các mẫu khác.
- Đặt bộ T2Bacteria Panel và/hoặc T2Candida lên máy T2Dx theo hướng dẫn.
- Nhấn “Load” trên màn hình cảm ứng, thao tác này sẽ đóng ngăn kéo và bắt đầu bảng điều khiển.
- T2Dx sẽ mở một ngăn có sẵn và nhắc người dùng load Panel. Đặt Panel vào ngăn kéo, đảm bảo rằng nó nằm ngang, tiếp xúc hoàn toàn với thanh ray kim loại và được đặt trên các chốt định vị. Nhấn “Next” trên màn hình cảm ứng.
- Khi hiện ra “Tear Off Label”, giữ Panel và tháo phần seal trên nắp. Chọn “Next” trên màn hình.
- Kiểm tra lại để chắc chắn toàn bộ phần nắp đã được tháo ra
- Scan hoặc chọn user ID, chắc chắn rằng đã có Sample ID và tên quy trình là “T2Candida 1.1” hoặc “T2Bacteria”

Khi hoàn thành, máy báo “Run Complete”. Nhấn Unload và làm theo hướng dẫn trên máy.

4.2. Nhận định kết quả:

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả

- Đọc kết quả và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
 - Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- * Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

177. Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định DNA/RNA đặc trưng của các vi sinh vật gây bệnh trong bệnh phẩm đường hô hấp của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của công nghệ phát hiện đa đích nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm loại để bàn
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch mũi hầu, dịch ngoáy họng, dịch tỵ hầu, dịch hút phế quản, dịch rửa phế quản.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- 10 μ L IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic như bảng sau. IC có thể được bổ sung vào dung dịch ly giải hoặc bổ sung vào hỗn hợp mẫu bệnh phẩm và dung dịch ly giải.

Bộ kit	IC
RP-1	Bổ sung 10 μ L PR-V IC
RP-2	Bổ sung 10 μ L PR-V IC
RP-3	Bổ sung 10 μ L PR-V IC
RP-4	Bổ sung 10 μ L PR-B IC (hoặc có thể bổ sung 2 μ L vào phản ứng PCR)

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Chạy real-time One-step RT-PCR (Tham khảo hướng dẫn sử dụng máy CFX96™ Real-time PCR System (Bio-rad):
- Bật thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix, cụ thể:
- Thành phần MasterMix với bộ kit RP 1, 2, 3 phát hiện virus:

5 μ L	5X MOM (tương ứng với từng bộ kit)
5 μ L	Rnase-free water (tương ứng với từng bộ kit)

5 µL	Real-time One-step Buffer (tương ứng với từng bộ kit)
2 µL	Real-time One-step Enzyme (tương ứng với từng bộ kit)
17 µL	Tổng thể tích Mastermix

- Thành phần MasterMix với bộ kit RP 4 phát hiện vi khuẩn:

5 µL	5X RP4 MOM
5 µL	EM2
5 µL	Rnase-free water
2 µL	RP-B IC (thay bằng 2 uL Rnase-free water nếu IC đã được bổ sung trong quá trình tách acid nucleic)
17 µL	Tổng thể tích Mastermix

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

- Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng. Chia 17 µl MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

- Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.
- Thêm 8 µl sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.
- Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.
- Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.
- Cài đặt chu trình nhiệt trên máy RT-PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Cài đặt sơ đồ mẫu

Chọn kênh màu: FAM, HEX, Cal Red 610 và Quasar 670

Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương.

Lưu ý: chọn loại đĩa: BR White

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC)

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích kết quả trong phần mềm phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

178. Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường ruột Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định DNA/RNA đặc trưng của các vi sinh vật gây bệnh trong bệnh phẩm phân của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của công nghệ phát hiện đa đích nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm loại để bàn
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- 10 µL IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic như bảng sau. IC có thể được bổ sung vào dung dịch ly giải hoặc bổ sung vào hỗn hợp mẫu bệnh phẩm và dung dịch ly giải.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Chạy real-time One-step RT-PCR (Tham khảo hướng dẫn sử dụng máy CFX96™ Real-time PCR System (Bio-rad):
- Bật thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

- Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng. Chia 20 µl MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

- Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.

- Thêm 5 μ l sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.
- Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.
- Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.
- Cài đặt chu trình nhiệt trên máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Cài đặt sơ đồ mẫu

Chọn kênh màu: FAM, HEX, Cal Red 610 và Quasar 670

Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương.

Lưu ý: chọn loại đĩa: BR White

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC)

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích kết quả trong phần mềm phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trùng quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

179. Vi sinh vật nhiễm khuẩn não - màng não Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định DNA/RNA đặc trưng của các vi sinh vật gây bệnh trong bệnh phẩm dịch não tủy của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của công nghệ và nguyên lý RT-PCR một bước, đa mồi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm loại để bàn
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch não tủy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- 10 µL IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic như bảng sau. IC có thể được bổ sung vào dung dịch ly giải hoặc bổ sung vào hỗn hợp mẫu bệnh phẩm và dung dịch ly giải.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Chạy real-time One-step RT-PCR (Tham khảo hướng dẫn sử dụng máy CFX96™ Real-time PCR System (Bio-rad):
- Bật thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

- Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng. Chia 15 µl MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

- Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.
- Thêm 5 µl sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.
- Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.
- Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.
- Cài đặt chu trình nhiệt trên máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Cài đặt sơ đồ mẫu

Chọn kênh màu: FAM, HEX, Cal Red 610 và Quasar 670

Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương.

Lưu ý: chọn loại đĩa: BR White

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC)

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

- Phân tích kết quả trong phần mềm phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Thông tin phân tích
- Kết quả dương khi giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) ≤ 45 .
- Kết quả âm khi giá trị chu kỳ ngưỡng là N/A.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

180. AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện các trực khuẩn bền vững với acid (AFB - acid fast bacillus) thuộc chi *Mycobacterium*.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Với kỹ thuật nhuộm huỳnh quang, AFB được phát hiện bởi hình thể trực khuẩn mảnh phát quang trên nền tối khi soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ thuốc nhuộm lao huỳnh quang
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Dầu soi kính
- Axit ngậm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ nhựa đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính mài một đầu
- Que lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi huỳnh quang
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Thiết bị sấy lam (nếu có)
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Đờm, dịch phế quản, dịch màng phổi được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị tiêu bản đạt tiêu chuẩn của CTCLQG
2	Cố định tiêu bản
3	Nhuộm màu bằng FAST Auramin O
4	Tẩy và nhuộm nền bằng FAST Decolorizer
5	Đọc và đánh giá kết quả trên kính hiển vi huỳnh quang

4.2. Nhận định kết quả

Quan sát AFB bằng vật kính 40 trên kính huỳnh quang đèn LED. AFB có hình ảnh trực khuẩn mảnh, hơi cong, đứng riêng lẻ, xếp đôi, song song hoặc từng đám. AFB bắt màu vàng sáng phát quang trên nền tối. Đếm số lượng AFB và ghi kết quả như bảng sau:

Số lượng AFB	Kết quả	Mức độ
>50AFB/1 vi trường (Đọc ít nhất 8 vi trường)	Dương tính	3 +
5-50AFB/1 vi trường (Đọc ít nhất 20 vi trường)	Dương tính	2+
20-199AFB/1 dòng (Đọc ít nhất 1 dòng)	Dương tính	1 +
1-19AFB /1 dòng	Dương tính	Ghi số lượng cụ thể
0 AFB /ít nhất 1 dòng	Âm tính	

Lưu ý: 1 dòng lam tương đương 40 vi trường.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù kỹ thuật được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Âm tính giả khi không lấy được đúng phần nhầy đờm,痰 lắng, có thể ly tâm lấy cặn nếu mẫu bệnh phẩm quá trong.
- Mỗi mẻ nhuộm không nên quá 12 tiêu bản, các tiêu bản để cách nhau ít nhất 1 cm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn:
 - + AFB phát quang yếu có thể do tiêu bản sau khi nhuộm không đọc ngay, tiêu bản bị tiếp xúc nhiều với ánh sáng.
 - + AFB phát quang yếu có thể do chất lượng hóa chất không đạt do bảo quản chưa đúng, quá hạn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

181. HIV đo tải lượng - Xpert

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định số lượng bản sao của Human Immunodeficiency Virus (HIV) có trong 1ml huyết thanh, huyết tương từ bệnh phẩm máu của bệnh nhân nhiễm HIV bằng hệ thống máy tự động GeneXpert.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý

Phản ứng sao chép ngược đoạn ARN đặc trưng của HIV thành ADN (phản ứng RT), sau đó sử dụng kỹ thuật real-time PCR nhân dòng và định lượng số đoạn ADN đặc trưng của HIV ban đầu dựa vào đường đồ thị tuyến tính được xây dựng từ các mẫu chứng dương có nồng độ chuẩn.

Định nghĩa

- HIV: Human Immunodeficiency Virus
- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay

- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μL - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μL - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μL - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μL - tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Máy GeneXpert
- Máy Scan mã vạch
- Máy tính đã cài đặt phần mềm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C)

- Micropipettes thể tích từ 5-1000 μ l

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh, máu toàn phần, dịch cơ thể
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 2 giờ

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Chuẩn bị sinh phẩm hoá chất vật tư theo hướng dẫn.
- Bật máy máy tính và xét nghiệm trước khi thực hiện xét nghiệm 15 phút.
- Hút 1.5 ml huyết tương hoặc huyết thanh/dịch cơ thể cho vào catridge, đậy chặt nắp.
- Cài đặt mẫu, loại mẫu và chương trình xét nghiệm trên máy tính.
- Quét mã vạch và đưa catridge vào trong máy, và thực hiện xét nghiệm.
- Đọc và phân tích kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Kết quả tải lượng HIV được định lượng tự động bằng máy GeneXpert dựa trên tín hiệu huỳnh quang.
- Kết quả chỉ trả được khi nội kiểm IQS-H và IQS-L đạt, các Probe check đạt

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nhầm lẫn mẫu bệnh nhân

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

182. HCV Xpert

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ

Phát hiện và định lượng RNA của HCV trong một đơn vị thể tích huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR trên hệ thống máy hoàn toàn tự động tách chiết, khuếch đại và phát hiện.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tăm bông vô trùng/dụng cụ lấy bệnh phẩm
- Môi trường bảo quản bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm chức năng:

- Bộ lưu điện
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương tách từ máu toàn phần chống đông EDTA
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 180 phút (3 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

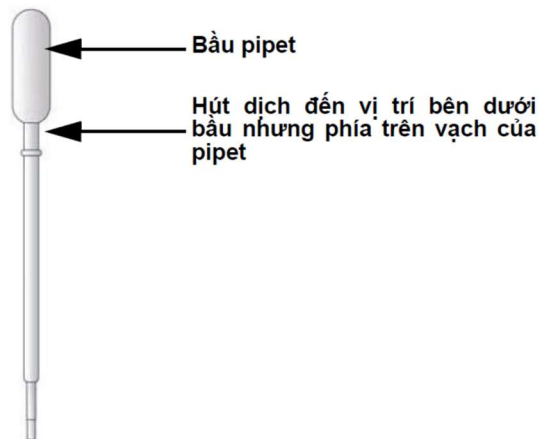
4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- *Máu toàn phần:* được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA.
- + Sau khi ly tâm mẫu máu toàn phần, có thể dùng pipet lấy trực tiếp 1 mL huyết tương vào khay xét nghiệm.
- + Nếu sử dụng mẫu đông lạnh, đặt mẫu ở nhiệt độ phòng (20–35°C) cho đến khi rã đông hoàn toàn và đạt nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- + Các mẫu huyết tương và huyết thanh được bảo quản ở 2-8°C nên được lấy ra khỏi tủ lạnh và để về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- + Mẫu huyết tương được bảo quản ở 2–8°C hoặc đông lạnh và rã đông nên được trộn trong 15 giây trước khi sử dụng, nếu mẫu bị vẩn đục, cần ly tâm nhanh để lấy phần dịch trong.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

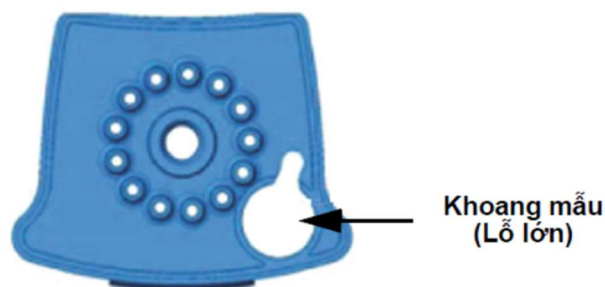
Chuẩn bị khay xét nghiệm

1. Mang găng tay bảo vệ dùng một lần.
2. Kiểm tra khay xét nghiệm xem có bị hư hỏng không. Nếu bị hư hỏng thì không sử dụng.
3. Mở nắp khay xét nghiệm.
 - Cách 1: Nếu sử dụng pipet có trong bộ dụng cụ (Hình 1), hút dịch đến vị trí bên dưới bầu nhưng phía trên vạch của pipet.
 - Cách 2: Nếu sử dụng pipet tự động, chuyển ít nhất 1 mL huyết tương hoặc huyết thanh vào khoang chứa mẫu của khay xét nghiệm (Hình 2). KHÔNG đổ trực tiếp mẫu vào khoang!



Hình 1: Pipet chuyển trong bộ xét nghiệm HIV VL

4. Đóng nắp khay xét nghiệm.
5. Lắp khay xét nghiệm vào thiết bị GeneXpert Dx hoặc hệ thống Infinity.



Tiến hành xét nghiệm

Quan trọng: Cần đảm bảo Tập Cài đặt xét nghiệm (ADF) HCV VL đã được nhập vào phần mềm trước khi bắt đầu thực hiện xét nghiệm.

Lưu ý: Các bước có thể thay đổi nếu quản trị viên hệ thống thay đổi quy trình làm việc mặc định của hệ thống.

Phần này liệt kê các bước cơ bản để thực hiện xét nghiệm. Để biết hướng dẫn chi tiết, xem *Hướng dẫn vận hành hệ thống GeneXpert Dx System* hoặc *Hướng dẫn vận hành hệ thống GeneXpert Infinity*, tùy thuộc vào kiểu máy đang được sử dụng.

1. Bật thiết bị GeneXpert:

- Nếu sử dụng thiết bị GeneXpert Dx System, trước tiên bật thiết bị và sau đó bật máy tính. Phần mềm GeneXpert sẽ tự động khởi chạy. Nếu phần mềm không tự chạy, nhấp đúp vào biểu tượng phần mềm GeneXpert Dx trên màn hình Windows®.

hoặc

- Nếu sử dụng thiết bị GeneXpert Infinity, bật nguồn thiết bị. Phần mềm GeneXpert sẽ tự động khởi chạy. Nếu phần mềm không tự chạy, nhấp đúp vào biểu tượng phần mềm Xpertise trên màn hình Windows®.

2. Đăng nhập vào phần mềm GeneXpert Instrument System bằng tên người dùng và mật khẩu.
3. Trong cửa sổ GeneXpert System, nhấp vào Create Test (GeneXpert Dx) hoặc Orders và Order Test (Infinity).
4. Quét ID bệnh nhân (tùy chọn). Nếu nhập ID bệnh nhân, đảm bảo rằng ID bệnh nhân được nhập chính xác. ID Bệnh nhân được liên kết với kết quả xét nghiệm và được hiển thị trong cửa sổ View Results.
5. Quét hoặc nhập ID mẫu. Nếu nhập ID mẫu, đảm bảo rằng ID mẫu được nhập chính xác. ID mẫu được liên kết với kết quả xét nghiệm và được hiển thị trong cửa sổ View Results và tất cả các báo cáo. Hộp thoại Scan Cartridge xuất hiện.
6. Quét mã vạch trên khay xét nghiệm HCV VL. Cửa sổ Create Test xuất hiện. Sử dụng thông tin có trong mã vạch, phần mềm tự động điền vào các ô cho các trường sau: Select Assay (Chọn Xét nghiệm), Reagent Lot ID (ID lô thuốc thử), Cartridge SN (số sê-ri khay xét nghiệm) và Expiration Date (ngày hết hạn).
7. Nhấp vào Start Test (GeneXpert Dx) hoặc Submit (Infinity). Nhập mật khẩu nếu được yêu cầu.
8. Đối với Hệ thống GeneXpert Infinity, đặt khay xét nghiệm lên băng truyền. Khay xét nghiệm sẽ được tự động nạp, thực hiện xét nghiệm và khay xét nghiệm đã sử dụng sẽ được đặt vào thùng chứa chất thải.

hoặc

Đối với thiết bị GeneXpert Dx System:

- A. Mở cửa mô-đun thiết bị với đèn xanh nhấp nháy và nạp khay xét nghiệm.
- B. Đóng cửa. Quá trình xét nghiệm bắt đầu và đèn xanh ngừng nhấp nháy. Khi xét nghiệm kết thúc, đèn sẽ tắt.
- C. Chờ hệ thống mở khóa cửa trước khi mở cửa mô-đun, sau đó tháo khay xét nghiệm.
- D. Thải bỏ các khay xét nghiệm đã sử dụng vào các thùng chứa chất thải mẫu bệnh phẩm theo quy trình thực hành tiêu chuẩn tại cơ sở.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Nhấp vào biểu tượng **View Results** để xem kết quả.

Sau khi hoàn thành xét nghiệm, nhấp vào nút **Report** của cửa sổ View Results để xem và/hoặc tạo tệp báo cáo PDF.

Mỗi xét nghiệm bao gồm vật liệu kiểm soát mức thể tích mẫu phù hợp (SVA), chuẩn nội định lượng mức cao và thấp (IQS-H và IQS-L, cũng hoạt động như một vật liệu kiểm soát xử lý mẫu [SPC]) và vật liệu kiểm soát kiểm tra mẫu dò (PCC).

- Mức thể tích mẫu phù hợp (SVA) - Đảm bảo mẫu đã được thêm vào khay xét nghiệm một cách chính xác. SVA xác nhận rằng thể tích mẫu chính xác đã được thêm vào khoang mẫu. SVA đạt nếu nó đáp ứng các tiêu chí chấp nhận đã được thẩm định. Nếu SVA không đạt, ERROR 2096 sẽ xuất hiện nếu không có mẫu hoặc ERROR 2097 sẽ xuất hiện nếu không có đủ mẫu. Hệ thống sẽ ngăn người dùng tiếp tục thực hiện xét nghiệm.
- Chuẩn nội định lượng mức cao và thấp (IQS-H và IQS-L) - IQS-H và IQS-L là hai RNA bọc (Armored RNA[®]) ở dạng hạt khô và trải qua toàn bộ quy trình xét nghiệm. IQS-H và IQS-L là các chất chuẩn được hiệu chuẩn theo chất chuẩn quốc tế thứ 4 của WHO đối với HIV. Các chất chuẩn này được sử dụng để định lượng bằng cách sử dụng các thông số cụ thể của lô để tính toán nồng độ RNA HIV trong mẫu. Ngoài ra, IQS-H và IQS-L phát hiện sự ức chế phản ứng RT-PCR liên quan tới mẫu thử. IQS-H và IQS-L đạt nếu đáp ứng các tiêu chí chấp nhận đã được xác nhận.
- Vật liệu kiểm soát kiểm tra mẫu dò (PCC) - Trước khi bắt đầu phản ứng PCR, Hệ thống thiết bị GeneXpert đo tín hiệu huỳnh quang từ các mẫu dò để theo dõi hoàn nguyên hạt, mức dịch trong ống phản ứng, sự toàn vẹn của mẫu dò và độ ổn định của thuốc nhuộm. PCC sẽ được đánh giá đạt nếu đáp ứng các tiêu chí chấp nhận đã được thẩm định.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

* Kết quả được hệ thống thiết bị GeneXpert diễn giải tự động từ các tín hiệu huỳnh quang đo được và các thuật toán tính toán nhúng và được hiển thị rõ ràng trong cửa sổ View Results. Các kết quả có thể xảy ra được mô tả trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xét nghiệm HCV VL và diễn giải

Kết quả	Diễn giải
HCV DETECTED XX IU/mL (log X.XX)	RNA HCV được phát hiện ở nồng độ XX IU/mL. • RNA HCV có hiệu giá trong phạm vi dải tuyến tính cài đặt của xét nghiệm và điểm cuối nằm trên nồng độ tối thiểu. • IQS-H và IQS-L: PASS (ĐẠT). • Kiểm tra mẫu dò: PASS; tất cả các kết quả kiểm tra mẫu dò đều đạt.

Kết quả	Diễn giải
HCV DETECTED > 1.00E08 IU/mL	RNA HCV được phát hiện cao hơn dải định lượng của xét nghiệm. • IQS-H và IQS-L: PASS. • Kiểm tra mẫu dò: PASS; tất cả các kết quả kiểm tra mẫu dò đều đạt.
HCV DETECTED < 10 IU/mL	RNA HCV được phát hiện thấp hơn dải định lượng của xét nghiệm. • IQS-H và IQS-L: PASS. • Kiểm tra mẫu dò: PASS; tất cả các kết quả kiểm tra mẫu dò đều đạt.
HCV NOT DETECTED	Không phát hiện RNA HCV. • IQS-H và IQS-L: PASS. • Kiểm tra mẫu dò: PASS; tất cả các kết quả kiểm tra mẫu dò đều đạt.
INVALID	Không thể xác định được sự có mặt hay vắng mặt của RNA HCV. Lập lại xét nghiệm. • IQS-H và/hoặc IQS-L: FAIL (KHÔNG ĐẠT); Ngưỡng chu kỳ (Cts) không nằm trong phạm vi hợp lệ và điểm cuối nằm dưới cài đặt tối thiểu. • Kiểm tra mẫu dò: PASS; tất cả các kết quả kiểm tra mẫu dò đều đạt.
ERROR	Không thể xác định được sự có mặt hay vắng mặt của RNA HIV. Lập lại xét nghiệm theo hướng dẫn trong Mục 16.2, Quy trình xét nghiệm lại. • Kiểm tra mẫu dò: FAIL*; tất cả hoặc một trong các kết quả kiểm tra mẫu dò không đạt. * Nếu kiểm tra mẫu dò đạt, lỗi là do giới hạn áp suất tối đa vượt quá phạm vi chấp nhận được hoặc do lỗi thành phần hệ thống.
NO RESULTS	Không thể xác định được sự có mặt hay vắng mặt của RNA HCV. Lập lại xét nghiệm theo hướng dẫn trong quy trình xét nghiệm lại. Kết quả NO RESULT cho thấy dữ liệu được thu thập không đầy đủ. Ví dụ, quá trình xét nghiệm bị dừng giữa chừng bởi người vận hành.

* Nếu có bất kỳ kết quả xét nghiệm nào nêu dưới đây xảy ra, cần lập lại xét nghiệm:

- Kết quả INVALID.

- Kết quả ERROR

- Kết quả NO RESULT

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kết quả có thể bị sai lệch do sử dụng khay xét nghiệm đã bị rơi sau khi lấy ra khỏi bao bì, do lắp khay xét nghiệm, khay xét nghiệm có ống phản ứng bị hỏng hoặc khay xét nghiệm đã bị rò rỉ.
- Kết quả INVALID chứng tỏ do một hoặc nhiều nguyên nhân sau:
 - Cts IQS-H và/ hoặc IQS-L không nằm trong phạm vi hợp lệ.
 - Mẫu không được xử lý đúng cách hoặc quy trình PCR bị ức chế.
- Kết quả ERROR chứng tỏ rằng xét nghiệm đã bị hủy bỏ. Các nguyên nhân có thể xảy ra bao gồm: lượng mẫu được thêm vào không đủ, ống phản ứng được đổ đầy không đúng cách, mẫu dò không còn nguyên vẹn, hoặc áp suất vượt quá giới hạn tối đa.
- Kết quả NO RESULT chứng tỏ rằng dữ liệu được thu thập không đầy đủ. Ví dụ: quá trình xét nghiệm bị dừng giữa chừng bởi người vận hành hoặc xảy ra sự cố mất điện.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục..

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

183. MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) PCR hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện gen đặc trưng của *Mycobacterium tuberculosis* trong mẫu bệnh phẩm đờm, các loại dịch sinh học, mủ, phân và mảnh sinh thiết lấy từ người bằng hệ thống máy PCR tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Sự hiện diện của *Mycobacterium tuberculosis* được biểu hiện bởi sự phát triển huỳnh quang của chất phát huỳnh quang FAM. Chứng nội chuẩn được bổ sung vào mẫu bệnh phẩm giúp kiểm soát các yếu tố gây ức chế phản ứng PCR. Tín hiệu chứng nội được phát hiện nhờ chất phát huỳnh quang HEX.

Định nghĩa: *Mycobacterium tuberculosis*: Vi khuẩn lao

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy PCR tự động và máy vi tính có cài đặt phần mềm.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: đờm, các loại dịch sinh học (dịch phế quản, dịch não tủy, dịch màng bụng, dịch màng tim, nước tiểu, mủ..), phân và mô sinh thiết.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Bệnh phẩm nhầy, nhớt nhiều như đờm, dịch phế quản, dịch khớp cần được xử lý để thuần nhất mẫu bệnh phẩm trước khi tách chiết.
- Những bệnh phẩm không bị nhầy nhớt như dịch não tủy, nước tiểu, có thể sử dụng để tách chiết DNA luôn.
- Nếu chưa tách chiết ngay, bảo quản mẫu ở -20°C (phải trộn đều trước khi tách chiết)

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tách chiết DNA và thực hiện phản ứng real-time PCR trên hệ thống máy tự động.

- Bật nguồn điện máy vi tính của hệ thống, bật máy tách chiết và máy PCR.
- Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy.
- Chuẩn bị mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm để tách chiết
- Các hóa chất, sinh phẩm, bệnh phẩm được lưu giữ trong tủ âm nên được rã đông ở nhiệt độ phòng ít nhất 10 phút trước khi sử dụng.
- Sử dụng ống chứa mẫu bệnh phẩm Sample Loading Tube-DNA IPC để tách chiết trên hệ thống máy tách tự động.
- Đánh số mẫu bệnh phẩm, mẫu NC đặt ở vị trí đầu tiên của mẻ tách, mẫu PC đặt ở vị trí thứ 2 của mẻ tách, các vị trí tiếp theo để mẫu bệnh phẩm.
- Thêm $400\ \mu\text{l}$ Buffer... vào ống mẫu ghi mẫu chứng NC và PC, thêm $5\ \mu\text{l}$ DEPC DW vào ống ghi mẫu chứng NC, $5\ \mu\text{l}$ PC vào ống ghi mẫu chứng PC (tổng lượng mẫu dùng để tách chiết NC và PC là $405\ \mu\text{l}$)
- Thêm $400\ \mu\text{l}$ bệnh phẩm vào các ống đánh số mẫu bệnh phẩm tương ứng.

- Chuẩn bị ống premix:
 - + Chuẩn bị số lượng ống premix tương ứng với số lượng ống chứng và ống mẫu bệnh phẩm.
 - + Đưa các mẫu đối chứng, mẫu bệnh phẩm đã chuẩn bị ở trên, các ống premix vào máy tách.
- Chuẩn bị các vật tư, hóa chất tách chiết theo như hướng dẫn sử dụng máy.
- Mở phần mềm ExiStationManager trên máy vi tính.
- Trên thanh công cụ Prep hiển thị ba ô cửa tương ứng với 3 máy tách chiết.
- Nhập các số liệu tương ứng với từng dòng trên từng máy tách.
- Nhấn nút ► và làm theo hướng dẫn để bắt đầu quá trình tách chiết. Chú ý thời gian tách chiết để có thể đưa sản phẩm vào chạy realtime PCR sớm nhất (thời gian tối đa sau khi tách xong phải cho vào máy chạy PCR là 120 phút)
- Đưa sản phẩm máy tách chiết ra khỏi hệ thống tách chiết, dùng dụng cụ đã cho của hãng cung cấp lấy cẩn thận ống premix ra khỏi khay cơ sở.
- Dùng kéo cắt Optical Film với kích thước phù hợp và dùng Optical Film Applicator để gắn chặt lên các ống nghiệm premix.
- **Chú ý:** Để tránh lây nhiễm chéo và cho kết quả sai lệch, hãy gắn thật cẩn thận.
- Để hòa tan các hạt premix, và khuấy trộn premix với mẫu DNA, hãy dùng máy trộn, lắc chuyên dụng và thực hiện 20 chu kỳ, tốc độ 2500 rpm, theo chu kỳ: spin-down 5 giây/lắc mạnh: 20 giây.
- **Chú ý:** PCR premix có sẵn các thuốc thử PCR được đông khô. Khuấy trộn premix không hiệu quả có thể cho kết quả PCR không chính xác, vì thế hãy khuấy trộn premix thật kỹ trước khi dùng.
- Khi máy trộn, lắc đang làm việc, hãy khởi động phần mềm chạy máy Real-time PCR.
- Khi máy trộn, lắc kết thúc, chuyển các ống phản ứng vào máy Real-time PCR ngay.
- Nhấn nút Standby Power Switch. Đèn LED sẽ đỏ.
- Nhấn giữ nút Power 2 giây, sau khi máy tự kiểm tra, đèn LED sẽ lên màu xanh sau một tiếng “bíp” ngắn.
- Nhấn giữ nút Door 2 giây, cửa mở, đưa các ống phản ứng vào các vị trí định sẵn.
- Tiếp tục làm theo hướng dẫn sử dụng máy.

Chú ý: Nếu chạy ít hơn 6 hàng PCR, đưa các ống trống vào vị trí đối diện ở hàng thứ 12 để cân bằng áp lực của nắp nhiệt.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

Mẫu chứng	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương	+	$\pm$	Có giá trị
Chứng âm	-	+	Có giá trị

9.2. Các trường hợp cần kiểm tra lại:

Mẫu chứng	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương	-	+	Cần kiểm tra lại
Chứng âm	+	-	Cần kiểm tra lại

4.2.2. Đọc kết quả

- Mở chương trình ‘Analysis’ có biểu tượng trên màn hình, để biết chi tiết cách phân tích số liệu, vui lòng xem Hướng dẫn sử dụng máy.
- Chọn File>Open, chọn tiếp file (.ex3), file kết quả được lưu trữ trong thư mục đã định sẵn.
- Rất nhiều tab sẽ hiển thị như dưới đây. ‘MTB Real-Time PCR Kit’ tab được hiển thị như đã xuất hiện lúc đầu.
- Tab ‘MTB Real-Time PCR Kit’ sẽ hiển thị giá trị Ct được phân tích và quyết định có hiệu lực ở định dạng spreadsheet.
- Well: Vị trí các giếng đối chứng (PC, IPC) và mẫu trên khối nhiệt 96 giếng.
- Sample ID: NTC, PC và tên mẫu đã đưa vào trong sơ đồ mẫu.
- IPC Result: Hiệu lực IPC tính theo giá trị Ct IPC của từng giếng. Nếu giá trị trong khoảng (cho sẵn) sẽ được gắn cờ ‘Valid’, nếu ngoài khoảng sẽ gắn cờ ‘Invalid’.
- Target Ct: Giá trị Ct MTB từng giếng, nếu xét nghiệm có giá trị, NTC sẽ được gắn cờ ‘Undetermined’ và giá trị Ct PC sẽ ở trong khoảng

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể

lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

184. MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện gen đặc trưng của phức hợp vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* trong mẫu bệnh phẩm đờm, các loại dịch sinh học, mủ, phân và mảnh sinh thiết lấy từ người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

Định nghĩa: *Mycobacterium tuberculosis*: Vi khuẩn lao

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm loại để bàn
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: đờm, các loại dịch sinh học (dịch phế quản, dịch não tủy, dịch màng bụng, dịch màng tim, nước tiểu, mủ..), phân và mô sinh thiết.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Bệnh phẩm nhầy, nhớt nhiều như đờm, dịch phế quản, dịch khớp cần được xử lý để thuần nhất mẫu bệnh phẩm trước khi tách chiết.
- Những bệnh phẩm không bị nhầy nhớt như dịch não tủy, nước tiểu, có thể sử dụng để tách chiết DNA luôn.
- Nếu chưa tách chiết ngay, bảo quản mẫu ở -200C (phải trộn đều trước khi tách chiết)

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (μl)	25	50	100	200
Thể tích IS (μl)	2,5	5	10	20

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau: $Số\ lượng\ ống\ (N) = Số\ bệnh\ phẩm + số\ chứng + 2$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia 30 μl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

- * *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.
- Cho vào mỗi ống PCR 10 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 µl chứng dương và 10 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 40 µl.
 - Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
 - Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:
 - Màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện *M.tuberculosis*, màu HEX cho chứng nội.
 - Chu kỳ nhiệt:
 - + 1 chu kỳ: 37°C/2 phút
 - + 1 chu kỳ: 95°C/10 phút
 - + 45 chu kỳ: 95°C/5 giây
 - 60°C/40 giây – đọc sản phẩm
 - 72°C/20 giây
 - Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
 - Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

TT	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương (Ct trong khoảng từ 15 – 38)	+	±	Có giá trị
Chứng âm	-	+	Có giá trị

- Các trường hợp cần kiểm tra lại:

TT	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương	-	+	Cần kiểm tra lại
Chứng âm	+	-	Cần kiểm tra lại

4.2.2. Đọc kết quả

TT	Màu FAM	Màu HEX	KẾT QUẢ
1	+	±	Dương tính với <i>M.tuberculosis</i>
2	-	+ (Ct<38)	Âm tính với <i>M.tuberculosis</i>
3	-	+ (Ct>38)	Không có giá trị
4	-	-	Không có giá trị

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: ⇒ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử ⇒ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu (Ct > 36): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
⇒ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
⇒ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
⇒ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
 - Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- * Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

185. NTM (*Nontuberculous mycobacteria*) định danh Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định DNA đặc trưng của NTM (*Nontuberculous mycobacteria*) trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Xét nghiệm được thực hiện trên hệ thống máy PCR tự động.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm MTB & NTM Real-time PCR kit (VD hoặc tương đương).
- Hóa chất tiền xử lý mẫu bệnh phẩm
- Sinh phẩm & vật tư tiêu hao cho tách chiết
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 30 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Môi trường bảo quản bệnh phẩm

- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Bộ pipette (6 cái/bộ)
- Giấy thấm không bụi
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Đờm, các dịch sinh học (dịch phế quản, dịch não tủy, nước tiểu, phân...), mảnh sinh thiết ...
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Đờm

- Xử lý đờm bằng dung dịch EZ: Thêm thể tích tương đương của Dung dịch EZ (Cat.No. K-4418-4) vào mẫu đờm và lắc trộn mạnh bằng máy vortex trong 3 phút. Sau đó ủ mẫu trong 20 phút ở nhiệt độ phòng.
- Lưu ý: Nếu mẫu quá nhớt, thêm gấp đôi thể tích Dung dịch EZ hoặc kéo dài thời gian ủ lên đến 30 phút.

b. Dịch phế quản (BAL)

- Trộn mẫu vừa đủ bằng máy vortex trong 1 phút. Chuyển 1 ml sang tube eppendorf 1,5 ml vô trùng
- Lưu ý: Nếu mẫu nhớt, thêm NaOH 200 μ l 10 N và ủ ở nhiệt độ phòng (25 ° C) trong 15 phút.
- Ly tâm ở tốc độ 9.000 vòng / phút trong 5 phút và loại bỏ phần nước nổi phía trên.
- Thêm 1 ml 1x PBS hoặc nước muối thông thường, xoáy trong 30 giây, ly tâm mẫu ở tốc độ 9.000 vòng / phút trong 5 phút, và loại bỏ phần nổi phía trên. Lặp lại bước giặt này 3 lần.
- Lưu ý: Nếu lớp trắng hình thành phía trên viên tế bào, hãy loại bỏ lớp có phần nổi phía trên và để lại viên tế bào
- Phần cặn còn lại được sử dụng để tách chiết DNA.

c. Nước tiểu

- Chuyển 5 ~ 10 ml mẫu nước tiểu vào ống hình nón
- Ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng / phút trong 20 phút và loại bỏ phần nước nổi phía trên.

- Phần cặn còn lại được sử dụng để tách chiết DNA

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

Tách chiết DNA bằng hệ thống máy tự động.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy.

- Số lượng các ống đối chứng (PC, IPC) và axit nucleic đã tách (nếu để đông lạnh) nên được rã đông ở nhiệt độ phòng ít nhất 10 phút trước khi sử dụng. Ít nhất 4 ống premix (2 NTC, 2 PC) cần cho đối chứng thí nghiệm, vì thế số ống premix cần là:

4 (Đối chứng thí nghiệm) + số ống mẫu

- Vortex hơn 10 giây và ly tâm nhanh tất cả thuốc thử đối chứng và mẫu bệnh phẩm trước khi dùng.
- Mỗi phản ứng, trộn 44 μl of DEPC DW với 1 μl of IPC. Chuẩn bị nhiều hơn 1 ống so với số lượng cần để tránh trường hợp mất dung dịch do dính ống. Vortex và spin-down các ống 10 giây trước khi dùng. Nhỏ 45 μl hỗn hợp phản ứng đã pha trộn vào tất cả các ống premix.
- Nhỏ 5 μl DEPC DW vào các giếng NTC ở vị trí A1. Đậy các ống để tránh nhiễm chéo trong quá trình chuẩn bị
- Chuyển tất cả các ống đến một khu vực riêng trước khi chạy PCR để tránh nhiễm chéo. Nhỏ 5 μl PC vào các ống sẽ được đặt ở vị trí C1 và D1.
- Nhỏ 5 μl dịch chiết axit nucleic acid vào các giếng còn lại, ghi chú là mẫu nào tương ứng với mẫu bệnh phẩm gốc nào.
- Dùng kéo cắt Optical Film với kích thước phù hợp và dùng Optical Film Applicator để gắn chặt lên các ống nghiệm.

Chú ý: Để tránh lây chéo và cho kết quả sai lệch, hãy gắn thật cẩn thận.

- Để hòa tan các hạt premix, và khuấy trộn premix với mẫu DNA và thực hiện 20 chu kỳ, tốc độ 2500 rpm, theo chu kỳ: spin-down 5 giây/lắc mạnh: 20 giây.
- Khuấy trộn premix không hiệu quả có thể cho kết quả PCR không chính xác, vì thế hãy khuấy trộn premix thật kỹ trước khi dùng.

Nhấn nút Standby Power Switch. Đèn LED sẽ đỏ

- Nhấn giữ nút Power 2 giây, sau khi máy tự kiểm tra, đèn LED sẽ lên màu xanh sau một tiếng “bíp” ngắn.
- Nhấn giữ nút Door 2 giây, cửa mở, đưa các ống phản ứng vào các vị trí định sẵn: NTC ở vị trí A1, B1; các ống PC ở vị trí C1, D1. Sau đó nhấn nút Door 2 giây để đóng cửa.

Chú ý: Nếu chạy ít hơn 6 hàng PCR, đưa các ống trống vào vị trí đối diện ở hàng thứ 12 để cân bằng áp lực của nắp nhiệt.

Dùng chương trình tạo định dạng file '*.xls' để tạo bản đồ chạy mẫu

- Lưu file ở định dạng '*.xls' ở vị trí dễ tìm.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC)

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mở chương trình 'ExiDiagnosis Analysis' có biểu tượng trên màn hình.
- Chọn File>Open, chọn tiếp file (.ex3), file kết quả được lưu trữ trong thư mục 'C:\ExiDiagData\GUEST'.
- Rất nhiều tab sẽ hiển thị như dưới đây. 'MTB & NTM Real-Time PCR Kit' tab được hiển thị như đã xuất hiện lúc đầu.
- Tab 'MTB & NTM Real-Time PCR Kit' sẽ hiển thị giá trị Ct được phân tích.
 - Well: Vị trí các giếng đối chứng (PC, IPC) và mẫu trên khối nhiệt 96 giếng.
 - Sample ID: NTC (chứng âm), PC (chứng dương) và tên mẫu đã đưa vào trong Bản đồ mẫu.
 - IPC Result: Hiệu lực IPC (chứng nội) tính theo giá trị Ct IPC của từng giếng. Nếu giá trị trong khoảng (cho sẵn) sẽ được gán cờ 'Valid', nếu ngoài khoảng sẽ gán cờ 'Invalid'.
 - Target Ct: Giá trị Ct MTB & NTM từng giếng, nếu xét nghiệm có giá trị, NTC sẽ được gán cờ 'Undetermined' và giá trị Ct PC sẽ ở trong khoảng.
 - Kết quả cuối cùng: Trình bày kết quả cuối cùng của các đối chứng và mẫu.
 - + Kết quả mẫu chứng: Nếu giá trị MTB và NTM Ct của mỗi chứng nằm trong phạm vi được chỉ định của nó, thì nó được gán cờ 'Valid'. Nếu kết quả chứng được gán cờ "Invalid", hãy thực hiện lại xét nghiệm.
 - + Kết quả mẫu bệnh phẩm: Kết quả mẫu được gán cờ "Detected" hoặc "Non-Detected" theo giá trị Ct của MTB và NTM.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

186. Đơn bào đường ruột nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện đơn bào đường ruột gây bệnh (*Isospora belli*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*) trong phân bằng phương pháp nhuộm soi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Một số đơn bào đường ruột có đặc điểm kháng cồn/acid nên có thể được phát hiện bằng kỹ thuật nhuộm Ziehl-Neelsen.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Thuốc nhuộm đỏ Fucsin
- Axit H₂SO₄
- Cồn tẩy 96 độ
- Thuốc nhuộm Xanh methylen
- Dung dịch lugol
- Dầu soi kính
- Cồn 70 độ (vệ sinh dụng cụ)
- Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)
- Axit ngậm lam
- Cồn sát trùng tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Lọ nhựa đựng bệnh phẩm
- Pipet nhựa tiết trùng hút bệnh phẩm
- Lam kính mài một đầu
- Que cấy vô trùng
- Bông
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Đèn cồn

- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Bút viết kính
- Bút bi
- Bật lửa
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ.
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Dùng que gỗ lấy phân phết lên lam kính, để khô
2	Nhỏ dung dịch đỏ Fucsin phủ kín lên trên bệnh phẩm
3	Rửa nước
4	Tẩy màu bằng H ₂ SO ₄ 5% đến khi hết màu đỏ.
5	Rửa nước
6	Nhỏ dung dịch xanh methylen
7	Rửa nước
8	Quan sát dưới kính hiển vi vật kính 10X- 100X

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Dương tính

- Nang trứng của *Cryptosporidium* hình tròn bắt màu đỏ kích thước từ 4- 6µm.
- Nang trứng của *Cyclospora* hình tròn bắt màu đỏ kích thước từ 8- 10µm.
- Nang trứng của *Isospora* hình bầu dục bắt màu đỏ kích thước 20- 30 X 10- 19µm.

4.2.2. Âm tính

Không tìm thấy đơn bào đường ruột.

Lưu ý: Trong trường hợp xét nghiệm lần đầu âm tính, để phát hiện KST gây bệnh có thể xét nghiệm 2 mẫu phân tiếp theo trong vòng từ 7-10 ngày.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tẩy chưa hết màu đỏ Fucsin.
- Nếu bệnh phẩm dày để đủ thời gian nhưng vẫn còn màu đỏ Fucsin cần phải tẩy lại lần 2 bằng H₂SO₄ 5% đến khi bệnh phẩm phai hết màu đỏ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

187. Trứng giun soi tập trung

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện trứng giun đũa, tóc, móc trong mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nước muối bão hòa có tỷ trọng lớn hơn tỷ trọng của trứng giun đũa, tóc, móc vì vậy sẽ làm cho trứng giun nổi lên trên bề mặt của dung dịch và bám vào bề mặt của lá kính.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch NaCl 0,9%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ nhựa đựng bệnh phẩm
- Pipet nhựa tiết trùng hút bệnh phẩm
- Que lấy bệnh phẩm
- Lam kính mài một đầu
- Lamen kính
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)

- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Cho nước muối bão hòa vào lọ đựng bệnh phẩm (1/3 lọ), dùng que đánh tan bệnh phẩm
2	Nhỏ nước muối bão hòa vào gần đầy lọ gạt bỏ bệnh phẩm nổi trên bề mặt sau đó nhỏ tiếp dung dịch vào đầy miệng lọ
3	Đậy lá kính lên trên lọ bệnh phẩm để thời gian 15 phút
4	Nhấc lá kính đặt trên lam kính
5	Quan sát kính hiển vi ở vật kính 10X

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Dương tính

- Quan sát tất cả các vi trường ở vật kính 10X tìm trứng giun, chọn vi trường có số trứng giun cao nhất để đánh giá kết quả:
- Trứng giun dĩa hình tròn hoặc bầu dục kích thước 35-50 x 45-75 μ m, ngoài cùng là lớp Albumin xù xì bắt màu vàng, vỏ dày, trong là khối nhân sẫm màu. Ngoài ra có thể còn gặp trứng giun dĩa mất tầng Albumin.
- Trứng giun móc hình bầu dục kích thước 40-60 μ m màu trong vỏ mỏng, trong là khối nhân phân chia từ 2-4 .
- Trứng giun tóc hình bầu dục, kích thước 22-50 μ m giống hình quả cau, màu vàng vỏ dày, 2 cực có 2 nắp.

- Ghi tên trứng giun và mức độ nhiễm:

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| + 1 trứng giun / vi trường : | (+) |
| + 2 - 5 trứng giun / vi trường : | (++) |
| + 6 - 20 trứng giun / vi trường : | (+++) |
| + > 20 trứng giun / vi trường : | (++++) |

4.2.2. Âm tính

Không thấy trứng giun

Lưu ý: Trong trường hợp xét nghiệm lần đầu âm tính, để phát hiện KST gây bệnh có thể xét nghiệm 2 mẫu phân tiếp theo trong vòng từ 7-10 ngày.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không gạt bỏ bệnh phẩm nổi trên miệng lọ, kết quả có thể bị sai.
- Để thời gian quá ngắn trứng giun chưa kịp nổi trên bề mặt dung dịch.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.

- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

188. *Filaria* (Giun chỉ) ấu trùng trong máu nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện ấu trùng giun chỉ trong máu.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nhận định ấu trùng giun chỉ trong máu trên tiêu bản nhuộm Giemsa dựa trên hình thể, cấu tạo, kích thước và tính chất bắt màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Thuốc nhuộm Giemsa
- Dung dịch đệm
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Dầu soi kính
- Axit ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lam kính mài một đầu
- Ống đựng máu EDTA-K3 5ml
- Pipet nhựa tiệt trùng
- Que lấy bệnh phẩm
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chống đông.
- Lấy bệnh phẩm:
 - + *Thời gian lấy máu:* Lấy máu về đêm từ 22 giờ đêm đến 4 giờ sáng.
 - + *Cách lấy máu:* Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Làm 3 giọt máu đặc trên cùng 1 lam để khô
2	Pha dung dịch Giemsa cốt với dung dịch đệm nồng độ 10%
3	Nhuộm lam với dung dịch Giemsa đã pha để 10 phút
4	Rửa nước, để khô
5	Quan sát kính hiển vi vật kính 10X- 40X

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Ấu trùng giun chỉ có kích thước 180 - 220 X 5 - 6µm bắt màu xanh tím. Ngoài cùng là lớp áo dài hơn thân, trên thân có các hạt nhiễm sắc.
- Âm tính: Không tìm thấy ấu trùng giun chỉ.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù kỹ thuật được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Giọt máu đặc bị bong sau khi nhuộm do lấy máu quá nhiều hoặc khi rửa dưới vòi nước chảy mạnh.
- Lấy máu vừa phải, rửa dưới vòi nước chảy nhẹ hoặc đưa vào trong chậu rửa.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

189. *Demodex* nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện hình thái các loài *Demodex* gây bệnh ngoài da.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Hình thái *Demodex* được quan sát rõ khi bệnh phẩm được hòa tan trong dầu thực vật.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dầu thực vật (Oliu, đậu nành)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Pipet nhựa vô trùng
- Lam kính
- Lamen
- Panh
- Dao cùn đã tiệt trùng
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm

- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Chất bã.
- Lấy bệnh phẩm:
 - + Vị trí vùng mặt: Mũi, rãnh mũi má, giữa hai cung mày, cằm
 - + Ngoài ra, còn lấy ở vị trí khác: Lưng, Ngực...
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Dùng hai ngón trỏ và ngón cái nặn chất bã
2	Dùng dao cùn gạt lượng chất bã vừa nặn trên bề mặt da
3	Tập trung bệnh phẩm lên lam kính
4	Nhỏ dầu thực vật 10%
5	Hòa chất bã vào giọt dầu thực vật đến khi tan hoàn toàn
6	Đậy lamén, ấn nhẹ để bệnh phẩm ngấm hoá chất và dàn đều

4.2. Nhận định kết quả

Dùng vật kính 10X quan sát sơ bộ hình thể, đếm số lượng và độ tập trung của Demodex. Còn vật kính 20X, 40X nhận định rõ hình thể, cấu tạo của từng loại và từng giai đoạn Demodex.

- Quan sát kỹ đặc điểm hình thể của Demodex trưởng thành. Đối với Demodex trưởng thành, cơ thể chia làm 3 phần rõ rệt:
 - + Đầu: Có 1 đôi râu, ở giữa là cái mỏ nhọn, có thể chuyển động được.
 - + Ngực: Bốn đôi chân ngắn đối xứng nhau, chuyển động nhiều.
 - + Đuôi: Dạng hình ống giống như giun, bên trong chứa đầy hạt và không bào. Có thể chuyển động nhưng ít hơn so với chân.
- Có hai loài Demodex nhưng về hình thái chúng chỉ khác nhau ở phần đuôi (D. folliculorum đuôi dài, D. brevis đuôi ngắn). Còn phần đầu và ngực tương tự nhau
- Chiều dài của Demodex
 - + D.folliculorum: Con đực 0,219mm, con cái 0,294mm.
 - + D.brevis: Con đực 0,165mm, con cái 0,208mm.
- Đánh giá độ tập trung của Demodex
 - + Nếu độ tập trung của Demodex $>$ hoặc $=$ 5 con/ vi trường ở độ phóng đại thấp (100): Demodex là tác nhân gây bệnh.
 - + Nếu độ tập trung của Demodex $<$ 5/ vi trường ở độ phóng đại thấp (100) thì Demodex chưa hẳn là tác nhân gây bệnh.
- Bên cạnh đó, trên tiêu bản dầu thực vật có thể quan sát được sự chuyển động của Demodex rất sinh động

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù kỹ thuật được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nặn chất bã vừa phải tương ứng với lượng dầu thực vật để chất bã tan hoàn toàn trong dầu thực vật.
- Hòa bệnh phẩm chưa tan hoàn toàn
- Dùng ngón tay dàn mỏng bệnh phẩm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

190. *Phthirus pubis* (Rận mu) nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện hình thái ký sinh trùng *Rận* gây bệnh ngoài da.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dưới tác dụng của glycerin hoặc dầu thực vật bộc lộ hình thái *Rận*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch KOH 10%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Dao cùn
- Kính lúp
- Panh
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Dao cùn
- Kính lúp
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)

- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Vảy da.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Dùng kính lúp soi vùng lông và da mu, chú ý vùng chân lông tìm rận mu, thân lông để tìm ấu trùng hoặc trứng. Sau đó, dùng lược mau chải từ chân lông ra ngọn một cách nhẹ nhàng và hứng vào 1 tờ giấy trắng.
2	Có thể dùng dao cùn cạo vùng lông và da mu, hứng vào lam kính.
3	Nhỏ 1 giọt KOH 20%, hoặc dầu Parafin, đặt lamén, soi ngay dưới kính hiển vi quang học.

4.2. Nhận định kết quả

Dùng vật kính 10X để quan sát

- Rận mu:
 - + Cơ thể chia làm 3 phần rõ rệt: Đầu có vòi, ăng ten, mắt đơn, ngực có 3 đốt, bụng có 9 đốt.
 - + Rận trưởng thành có 3 cặp chân, ấu trùng có 4 cặp chân đối xứng nhau.
- Ngoài ra, trên tiêu bản có thể thấy trứng rận bám trên thân lông.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù kỹ thuật được thực hiện đúng
- Bệnh nhân không bôi thuốc diệt ký sinh trùng trước đó 3-5 ngày.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lấy bệnh phẩm tại thương tổn không điển hình.
- Bệnh phẩm quá dày hoặc quá mỏng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Phân biệt với Rận gây bệnh ở súc vật: Rận, Ghẻ chó, mèo...
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

191. *Sarcoptes scabies hominis* (ghẻ) soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện hình thái ký sinh trùng ghẻ gây bệnh ngoài da.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dưới tác dụng của KOH 10% biểu mô sừng mềm và mỏng do đó bộc lộ hình thái ghẻ.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch KOH 20%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Axit ngậm lam
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Que lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Dao cùn tiệt trùng
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Vẩy da.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Xác định luống ghẻ.
2	Làm test BI.
3	Nhỏ dung dịch KOH 10%, đẩy lamén xem dưới kính hiển vi.

4.2. Nhận định kết quả

- Cái ghẻ

- + Hình thái: Cơ thể chia làm 3 phần rõ rệt. Hình dạng bầu dục, màu trắng xám, miệng ngắn lưng gồ.
- + Con trưởng thành có 4 cặp chân, ấu trùng có 3 cặp chân đối xứng nhau
- Ngoài ra, thấy các thành phần khác như: Trứng, ấu trùng hoặc chất thải của Ghê.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù kỹ thuật được thực hiện đúng.
- Lấy bệnh phẩm tại thương tổn không điển hình.
- Bệnh phẩm nhiều vảy da.
- Bệnh nhân không bôi thuốc diệt ký sinh trùng trước đó 3-5 ngày.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Bệnh phẩm quá dày hoặc quá mỏng.
- Trong bệnh phẩm phân, có thể nhầm với trứng giun sán khác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phân biệt với ghê gây bệnh ở súc vật: ghê chó, mèo...
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

192. *Cysticercus cellulosae* (Sán lợn) ấu trùng soi mảnh sinh thiết

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện các ấu trùng *Cysticercus cellulosae* (sán lợn) trong mảnh sinh thiết.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kính hiển vi quang học để xác định ấu trùng sán lợn trong tiêu bản soi trực tiếp dựa vào hình thể, kích thước, màu sắc.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch NaCl 0,9%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Axít ngâm lam
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Bông
- Lam kính
- Lamén
- Băng dính y tế
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Dao phẫu thuật
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Tổn thương da hoặc các tổ chức cơ quan, bộ phận trong cơ thể,... nghi ngờ có ấu trùng *Cysticercus cellulosae* (sán lợn).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

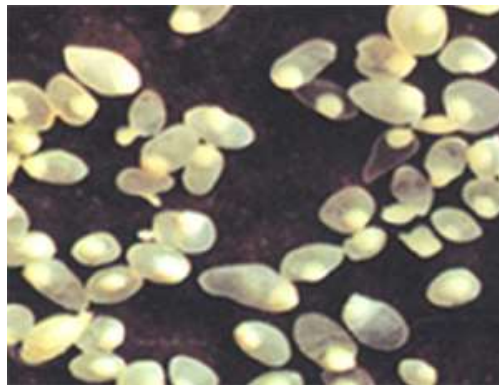
4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Dùng dao tách nhẹ nhàng khối u, bộc lộ từ ngoài vào trong, đến khi gặp tổ chức khác thường so với xung quanh (cục trắng giống hạt đu đủ non), thì nhẹ nhàng tách bỏ tổ chức đó ra khỏi khối u và đặt lên lam kính.
2	Dùng một lam kính khác, đặt lên lam kính có tổ chức rồi ép nhẹ 2 lam kính.
3	Dùng băng dính trắng, quấn 2 đầu của 2 lam ép, kết thúc quá trình làm lam.

4.2. Nhận định kết quả

Ấu trùng cư trú ở cơ vân: xuất hiện các nang dưới da với kích thước 17-20 x 7-10 mm, màu trắng đục nang chứa nước và có một đầu sán cùng với đốt cổ lộn vào bên trong, đầu có 4 giác và 2 vòng móc.



Nang ấu trùng *Cysticercus cellulosae*



Đầu ấu trùng

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Tách bệnh phẩm không đúng vị trí có ấu trùng, hoặc đúng nhưng không còn nguyên vẹn ấu trùng. Khắc phục bằng cách làm cẩn thận và chính xác.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Âm tính giả khi không lấy được đúng phần nhầy đờm, cặn lắng, có thể ly tâm lấy cặn nếu mẫu bệnh phẩm quá trong.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

193. *Gnathostoma* ấu trùng soi mảnh sinh thiết

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện ấu trùng *Gnathostoma* bằng phương pháp soi mảnh sinh thiết.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kính hiển vi quang học để xác định ấu trùng *Gnathostoma* trong mảnh sinh thiết trên tiêu soi trực tiếp dựa vào hình thể, kích thước, màu sắc.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch NaCl 0,9%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Axít ngậm lam
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Bông
- Lam kính
- Lamen
- Băng dính y tế
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Dao phẫu thuật
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Tổn thương các tổ chức dưới da, các đường hầm dưới da hoặc các ổ áp xe dưới da nghi ngờ có ấu trùng *Gnathostoma*.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

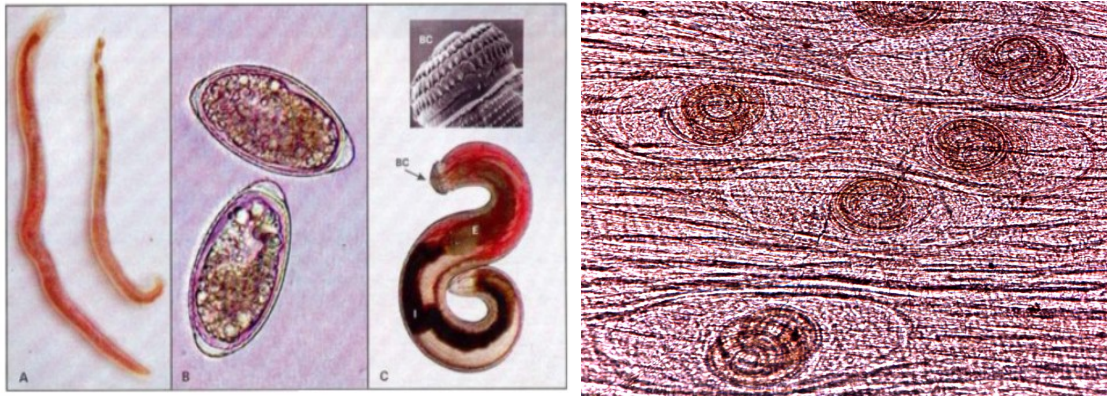
4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Nếu bệnh phẩm là tổ chức sinh thiết dưới da thì dùng dao tách nhẹ để tổ chức lên lam kính, dùng một lam kính khác ép nhẹ và dùng băng dính trắng quấn hai đầu lam.
2	Nếu bệnh phẩm là dịch ổ áp xe thì lấy dịch cho lên lam kính và ép lam giống như trên để soi kính hiển vi.
3	Soi kính hiển vi quang học vật kính 10X hoặc 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Ấu trùng có kích thước 3-4 mm xuất hiện trong mô hoặc trong ổ áp xe.
- Hình thể không cân đối một đầu to, một đầu nhỏ. Đầu có 4 hàng gai, chạy theo chiều ngang, gai to, thô, miệng gồm 2 môi.



4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù kỹ thuật được thực hiện đúng.
- Nếu dịch, lấy không đúng chỗ tổn thương, có ít hoặc không có ấu trùng. Khắc phục bằng cách lấy đúng vị trí và lấy nhiều bệnh phẩm, làm nhiều lần để tránh bỏ sót.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tách bệnh phẩm không đúng vị trí có ấu trùng, hoặc đúng nhưng không còn nguyên vẹn ấu trùng. Khắc phục bằng cách làm cẩn thận và chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

194. *Pneumocystis jirovecii* nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện *Pneumocystis jirovecii* có trong bệnh phẩm.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện *Pneumocystis jirovecii* bằng kỹ thuật nhuộm bạc dựa vào hình thể, kích thước, cấu tạo.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Thuốc nhuộm Giemsa
- Dung dịch đệm
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Dầu soi kính
- Axit ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lam kính mài một đầu
- Ống đựng máu EDTA-K3 5ml
- Pipet nhựa tiệt trùng
- Que lấy bệnh phẩm
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Máy lắc
- Máy ly tâm 3000 vòng/phút
- Tủ âm 60-70 độ C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Đờm, dịch rửa phế quản, phế nang, hoặc sinh thiết phổi.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Đối với dịch rửa phế quản, dịch màng phổi: lấy khoảng 2 ml vào ống thủy tinh ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút x 10 phút, lấy cạn.

- Đối với bệnh phẩm đờm: lấy khoảng 1ml đờm, cho thêm 1 ml nước muối sinh lý 0.9%, làm tan đờm bằng máy lắc hoặc đũa lắc thủy tinh sau đó ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút x 10 phút, lấy cạn.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Đùng que cấy lấy bệnh phẩm đã ly tâm lấy cạn dần tiêu bản lên lam kính (đường kính từ 1 - 1,5 cm) và để khô tự nhiên.
2	Ngâm lam trong dung dịch acid Chromic hoặc acid Perioric - 1 giờ, rồi rửa nước.
3	Ngâm trong dung dịch Gold clorid 0,1% - 1 phút, rửa nước
4	Ngâm trong dung dịch Bouins – 5 phút, rửa nước
5	Ngâm trong dung dịch Thiosunphat – 2 phút, rửa nước
6	Ngâm trong dung dịch Chromotrope 5% – 15 phút, rửa nước
7	Để khô tự nhiên và soi vật kính dầu với vật kính 100X

4.2. Nhận định kết quả

Có 4 hình thể khác nhau

- Thể hoạt động dạng nhỏ (đơn bội): Có hình quả trứng hoặc hình lưỡi liềm, kích thước 1 - 3 μm , có một nhân ở giữa, tế bào chất đậm đặc.
- Thể hoạt động dạng lớn (lưỡng bội): Có hình thể không đều, kích thước > 4 – 10 μm , có một nhân và tế bào chất loãng hơn.
- Thể tiền bào nang: Hình quả trứng, kích thước 3,5 - 5,5 μm , thành ngoài rất dày, thường nhẵn và đều, nhân chia nhiều mảnh (2 – 8 mảnh).
- Thể bào nang: hình tròn, kích thước 4 – 8 μm , thành bào nang tiếp tục dày thêm, bên trong có 8 ký sinh trùng non hoàn chỉnh. Mỗi ký sinh trùng con có một nhân, tế bào chất và một màng mỏng bao quanh. Các thể trong bào nang có hình tròn, quả chuối, hoặc dạng amíp.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Bệnh phẩm dịch lấy không đúng kỹ thuật, mảnh sinh thiết không đúng chỗ bị tổn thương, bệnh phẩm đờm lấy không đúng kỹ thuật (chỉ có nước bọt), đờm không qua xử lý làm tan sẽ không ly tâm lấy cạn được.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

195. *Taenia* (Sán dây) soi tươi định danh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phân biệt đốt sán dây bò và đốt sán dây lợn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kính hiển vi quang học để quan sát sự khác nhau về cấu trúc của đốt sán dây bò và đốt sán dây lợn trên tiêu bản nhuộm bằng mực tàu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Chất thử nhỏ giọt india ink
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Axit ngâm lam
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Que lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Dao cùn tiệt trùng
- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Đốt sán già theo phân ra ngoài hoặc tự ra ngoài.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Lấy bệnh phẩm phân có đốt sán hoặc đốt sán tự do không theo phân.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Dùng 1 lam kính đặt 1 đốt sán già lên lam kính, dùng một lam kính khác đặt lên đốt sán và ép nhẹ.
2	Lấy băng dính trắng quấn chặt 2 đầu lam kính
3	Dùng bơm tiêm 10, tiêm mực tàu vào lỗ sinh dục, để cho mực tàu thấm vào các nhánh tử cung.
4	Bằng mắt thường để quan sát chiều dài đốt sán và dưới kính hiển vi quang học vật kính 10X hoặc 40X để đếm số lượng nhánh tử cung.

4.2. Nhận định kết quả

- Sán dây lợn: Đốt già dài 10-12 mm, tử cung chia 6-12 nhánh
- Sán dây bò: Đốt già dài 18-20 mm, tử cung chia 18-35 nhánh.



Đốt sán dây bò
(*Taenia saginata*)



Đốt sán dây lợn
(*Taenia solium*)

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Quá trình tiêm phải chính xác đảm bảo mực tàu thấm hết cổ lượng nhánh tử cung, như vậy đếm mới chính xác số lượng nhánh tử cung.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

196. *Toxocara* (Giun đũa chó, mèo) soi mảnh sinh thiết

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện ấu trùng *Toxocara* (giun đũa chó, mèo) trong mảnh sinh thiết

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kính hiển vi quang học để xác định ấu trùng *Toxocara* trên tiêu bản soi trực tiếp dựa vào hình thể, kích thước.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Axit ngậm lam
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Dao tiểu phẫu
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Băng dính
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: mảnh sinh thiết ở các u hạt tại da hoặc các tổ chức, cơ quan, bộ phận trong cơ thể, ... nghi ngờ có ấu trùng Toxocara.
- Mảnh sinh thiết phải nguyên vẹn u hạt
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Dùng dao tách nhẹ nhàng mảnh sinh thiết, bóc lộ từ ngoài vào trong, đến khi gặp tổ chức khác thường so với xung quanh, thì nhẹ nhàng tách nang đó ra và đặt lên lam kính.
2	Dùng một lam kính khác, đặt lên lam kính có tổ chức rồi ép nhẹ 2 lam kính
3	Dùng băng dính trắng, quấn 2 đầu của 2 lam ép.
4	Soi ở vật kính 10X – 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Ấu trùng có kích thước kích thước 0,5-1mm xuất hiện trong bệnh phẩm sinh thiết.
- Âm tính: không thấy ấu trùng Toxocara.



4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Bệnh phẩm lấy không đúng chỗ tổn thương hoặc lấy nhưng các u hạt bị vỡ không còn nguyên vẹn.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lúc tiến hành làm vỡ u hạt hoặc lấy không được nguyên vẹn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

197. *Trichinella spiralis* (Giun xoắn) soi mảnh sinh thiết

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện ấu trùng *Trichinella spiralis* (Giun xoắn) trong mảnh sinh thiết

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kính hiển vi quang học để xác định ấu trùng *Trichinella spiralis* trên tiêu bản soi trực tiếp dựa vào hình thể, kích thước.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Axit ngậm lam
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Dao tiểu phẫu
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Băng dính
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Tổn thương cơ (thường gặp là cơ ở cơ đùi, cẳng chân) hoặc các tổ chức, cơ quan, bộ phận trong cơ thể, nghi ngờ có ấu trùng *Trichinella spiralis*.
- Các nang trong tổ chức cần lấy được nguyên vẹn
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Dùng dao tách nhẹ nhàng mảnh sinh thiết, bóc lộ từ ngoài vào trong, đến khi gặp tổ chức khác thường so với xung quanh, thì nhẹ nhàng tách nang đó ra và đặt lên lam kính.
2	Dùng một lam kính khác, đặt lên lam kính có tổ chức rồi ép nhẹ 2 lam kính
3	Dùng băng dính trắng, quấn 2 đầu của 2 lam ép.
4	Soi ở vật kính 10X – 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Ấu trùng cư trú ở cơ dếp, căng chân, xuất hiện các nang với kích thước 900 - 1300 x 35 - 49 μm , thường cuộn lại như vòng xoắn lò xo trong một nang hình quả cau ở tổ chức, trong một nang có thể có 2 – 3 ấu trùng.
- Âm tính: không thấy ấu trùng *Trichinella spiralis*.



4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Bệnh phẩm lấy không đúng chỗ tổn thương hoặc lấy nhưng các nang bị vỡ không còn nguyên vẹn.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lúc tiến hành làm vỡ nang hoặc lấy không được nguyên vẹn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
2. Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
3. Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

198. *Trichomonas vaginalis* nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện *Trichomonas vaginalis* gây bệnh đường sinh dục.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Trichomonas vaginalis được phát hiện qua hình thể, kích thước cấu tạo khi nhuộm Giemsa, soi dưới kính hiển vi quang học.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Metanol hoặc Cồn tuyệt đối
- Dung dịch Giemsa
- Dung dịch đệm Phosphate pH 7.2
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Bàn xét nghiệm
- Dụng cụ sấy lam (nếu có)

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Khí hư âm đạo
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

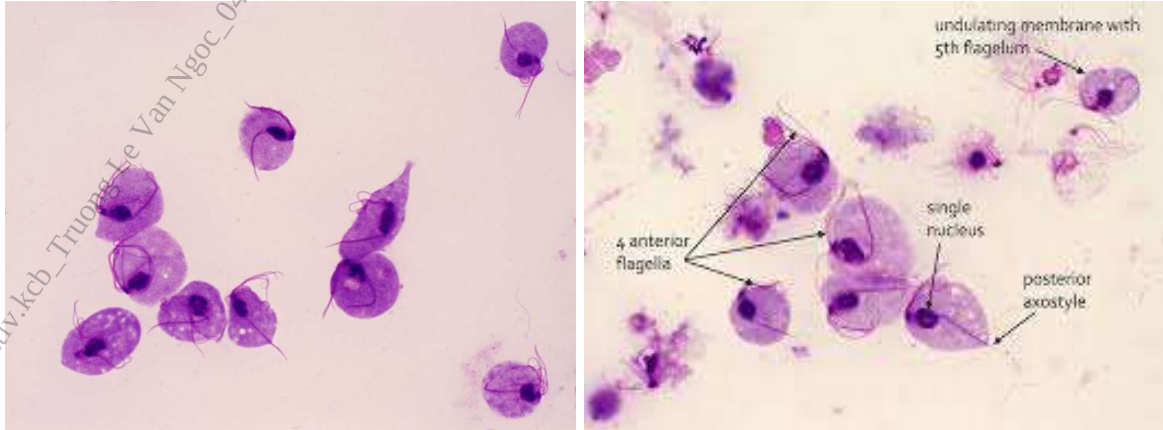
4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Dàn mỏng bệnh phẩm trên lam kính
2	Cố định tiêu bản bằng Metanol hoặc cồn tuyệt đối trong 30 giây, để khô tự nhiên.
3	Nhuộm Giemsa 10% (pha loãng bằng đệm Phosphate) trong 10 phút.
4	Rửa tiêu bản bằng nước sạch, để khô tự nhiên.
5	Soi ở vật kính 100X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Hình thể trùng roi giống hạt chanh, có 5 roi: 4 roi trước, 1 roi sau. Kích thước: 10-20µm x 5-12 µm. Nhân bắt màu tím đậm, nguyên sinh chất bắt màu tím nhạt.
- Âm tính: không thấy trùng roi.



4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Phết lam quá dày.
- Nhuộm sai thời gian, tiêu bản bắt màu không đẹp.
- Phân biệt trùng roi với bạch cầu.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

199. Xét nghiệm soi đờm tìm trứng sán lá phổi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định trứng sán lá phổi *Paragonimus* trong mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kính hiển vi quang học để xác định trứng sán lá phổi trên tiêu bản soi trực tiếp dựa vào hình thể, kích thước, màu sắc.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Đờm, dịch phế quản, dịch màng phổi được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

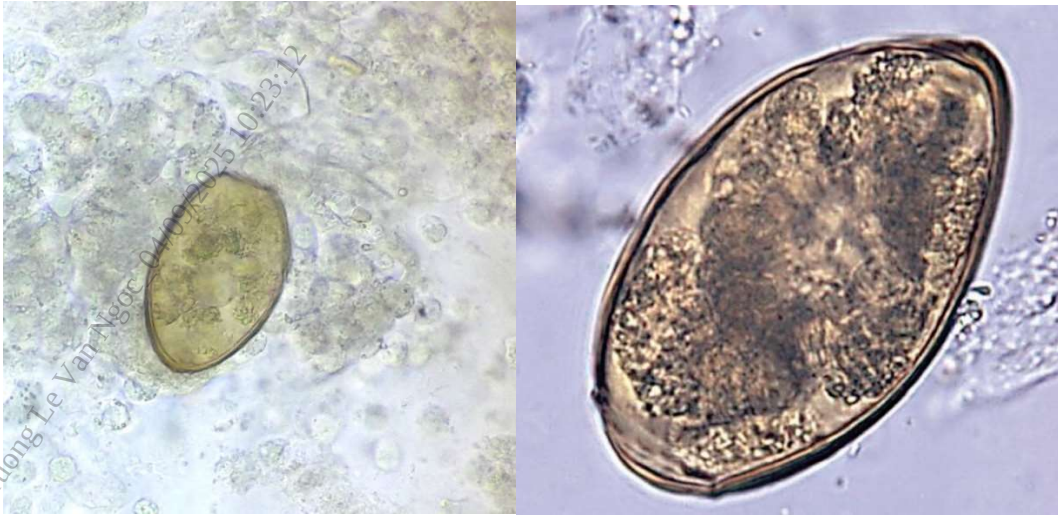
4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Dùng pipet lấy bệnh phẩm đờm, dịch phế quản (chú ý lấy được phần nhầy, dây đờm) hoặc dịch màng phổi (phần cặn lắng), nhỏ 1-2 giọt lên lam kính.
2	Đậy lamên lên giọt dịch.
3	Soi ở vật kính 10X – 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Thấy trứng sán lá phổi màu nâu sẫm, hình bầu dục, có nắp, kích thước: dài 80-100 μm , rộng 50-67 μm vỏ dày, bên trong có chứa phôi.
- Âm tính: không thấy trứng sán lá phổi.



4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Âm tính giả khi không lấy được đúng phần nhầy đờm, cặn lắng, có thể ly tâm lấy cặn nếu mẫu bệnh phẩm quá trong.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

200. Vi nấm nhuộm soi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện *Pneumocystis jirovecii*.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Pneumocystis jirovecii được phát hiện nhờ hình thể, kích thước, tính chất bắt màu khi nhuộm TBO (Toluidine Blue O).

1.3. Định nghĩa

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch Toluidine Blue O
- Dầu soi kính
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Axit ngậm lam
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Que lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Máy ly tâm
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Đờm, dịch phế quản.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Lấy bệnh phẩm phết lên lam kính, để khô
2	Phủ thuốc nhuộm TBO lên trên bệnh phẩm
3	Rửa nước, để khô.
4	Quan sát kính hiển vi vật kính 40X- 100X

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Dương tính

- Thể hoạt động *Pneumocystis jirovecii* kích thước từ 1- 4 μ m.
- Thể bào nang bắt màu xanh tím hình tròn vỏ mỏng kích thước 1- 7 μ m bên trong có từ 1-8 nhân.

4.2.2. Âm tính

- Không tìm thấy *Pneumocystis jirovecii*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Khi phết lam phải để bệnh phẩm khô mới tiến hành nhuộm tránh tiêu bản bị bong.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

201. *Vibrio cholerae* soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nhận định đặc điểm di động đặc trưng của *V. cholerae* trong bệnh phẩm phân hoặc từ huyền dịch vi khuẩn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Tính chất di động nhanh như tên bắn là đặc điểm đặc trưng của *V. cholerae*. Dựa vào đặc điểm di động này để có thể nhận định sơ bộ sự có mặt cả *V. cholerae* trong phân hoặc trong huyền dịch vi khuẩn.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Axit ngâm lam
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Que lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân lỏng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị một lam kính sạch, lấy một hoặc vài loop dịch nuôi cấy hoặc phân lỏng chuyển vào giữa lam kính.
2	Đậy lamên lên trên huyền dịch vi khuẩn hoặc giọt phân lỏng trên lam kính.
3	Soi ở vật kính x10 và x40 để quan sát sự di động của vi khuẩn.
4	Vứt bỏ lam soi vào bình chứa dung dịch sát khuẩn.

4.2. Nhận định kết quả

- Trục khuẩn di động như tên bắn là kết quả nghi ngờ sự có mặt của *V. cholerae*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù kỹ thuật được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Âm tính giả khi không lấy được đúng phần nhầy đờm, cặn lắng, có thể ly tâm lấy cặn nếu mẫu bệnh phẩm quá trong.
- Trong bệnh phẩm phân, có thể nhầm với trứng giun sán khác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

202. *Treponema pallidum* soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện sự có mặt của *Treponema pallidum* tại tổn thương vết chancre hoặc ở nốt hồng ban bằng phương pháp soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên hình ảnh sóng hình sin và tính chất di động đặc trưng của *T. pallidum* bằng kính hiển vi nền đen.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Nước muối sinh lý NaCL 90/00
- Cồn 70%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Lam kính
- Lamén
- Kim chủng
- Bơm kim tiêm
- khay đựng bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Bút viết kính

- Bút bi
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch tiết ở vết loét, sẩn, dịch chọc hạch...
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Tổn thương là vết trợt, vết loét: Rửa tổn thương bằng nước muối đẳng trương 0,9%, kẹp chặt thương tổn vào giữa ngón trỏ và ngón cái của bàn tay trái, dùng tăm bông sạch sát lên rìa thương tổn vài ba lần để lấy một ít dịch tiết thoát ra. Dàn lên một lam kính đã nhỏ sẵn một giọt nước muối sinh lý 0,9%.
- Tổn thương là sẩn, đào ban: Lau sạch tổn thương như trên. Dùng ngón chỏ cào nhẹ lên tổn thương lấy ít dịch (tránh làm chảy máu).
- Tổn thương là hạch: Cố định hạch bằng hai ngón tay, dùng bơm tiêm vô trùng bơm vào hạch một ít nước muối sinh lý 9%, day nhẹ hạch rồi hút ra một ít dịch.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị tiêu bản soi dưới kính hiển vi nền đen: Dàn bệnh phẩm lấy được vào giọt nước muối sinh lý 0,9% đã nhỏ sẵn trên lam kính, đẩy lamên lên
2	Soi ngay dưới kính hiển vi nền đen.

4.2. Nhận định kết quả

- Thường đọc dưới vật kính 40X.
- Xoắn khuẩn giang mai hình lò xo, vòng xoắn đều và mau, chiều dài khoảng 6-14 micromet, chiều ngang mảnh khoảng 0,15 micromet, trắng sáng trên nền đen, vừa tự dao động quanh trục vừa di chuyển.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Các tổn thương đã bôi chất sát khuẩn, uống thuốc kháng sinh hoặc tiêm thuốc kháng sinh đều khó tìm thấy xoắn khuẩn.
- Lấy bệnh phẩm lẫn nhiều máu, mủ thì khó nhận định.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả khi đọc có thể nhầm với xoắn khuẩn sốt hồi qui, xoắn khuẩn gây bệnh ghẻ cóc...
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

203. Hồng cầu, bạch cầu trong phân soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện hồng cầu, bạch cầu trong phân bằng kỹ thuật soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nhận định hồng cầu, bạch cầu trong phân khi làm tiêu bản soi tươi dưới kính hiển vi quang học dựa trên hình thể, kích thước, và cấu tạo.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- NaCl 0.9%
- Lugol 1%
- Axit ngậm lam
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Que lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)

- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

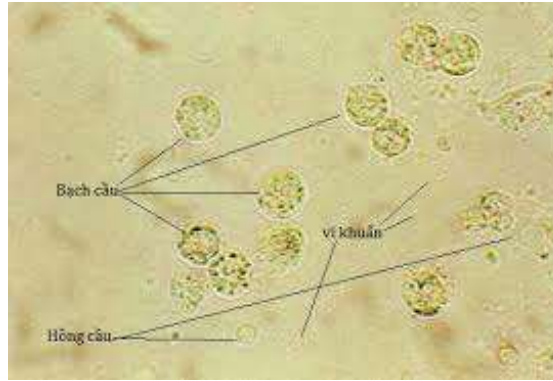
4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Nhỏ dung dịch NaCL 9 ‰ và dung dịch Lugol 1% lên trên một lam kính.
2	Dùng que lấy một lượng phân (bao kín đầu que) hòa đều với giọt NaCL 9 ‰ đến khi có màu đục, làm tương tự đối với giọt Lugol 1%.
3	Đặt lá kính lên trên giọt dung dịch.
4	Quan sát kính hiển vi ở vật kính 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính:

- + Hồng cầu: hình tròn kích thước 7-8 μ m màu hồng nhạt, trung tâm nhạt màu.
- + Hồng cầu thoái hóa: bờ răng cưa không đều.
- + Bạch cầu đa nhân hình tròn kích thước lớn 10 - 15 μ m.
- + Bạch cầu đơn nhân hình tròn, bầu dục, đa giác kích thước 20 - 25 μ m.
- Âm tính: không thấy hồng cầu, bạch cầu.



4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Phết lam quá dày hoặc quá mỏng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

204. Đơn bào đường ruột soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện đơn bào đường ruột gây bệnh (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Isospora belli*, *Trichomonas intestinalis*...) trong phân bằng kỹ thuật soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đơn bào đường ruột gây bệnh được phát hiện qua hình thể, kích thước, tính chất di động và bắt màu trong môi trường có NaCl 9‰ và Lugol 1% soi dưới kính hiển vi quang học.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- NaCl 0.9%
- Lugol 1%
- Axit ngậm lam
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Que lấy bệnh phẩm
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân

Lưu ý:

- Không lấy phân làm XN khi uống thuốc Bismuth hoặc Barium.
- Mẫu phân làm xét nghiệm tránh lẫn nước tiểu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Nhỏ dung dịch NaCL 9 ‰ và dung dịch Lugol 1% lên trên một lam kính.
2	Dùng que lấy một lượng phân (bao kín đầu que) hòa đều với giọt NaCL 9 ‰ đến khi có màu đục, làm tương tự đối với giọt Lugol 1%.
3	Đặt lá kính lên trên giọt dung dịch.
4	Quan sát kính hiển vi ở vật kính 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính:

- + Thể hoạt động của *Giardia* hình thìa kích thước 9-21 x 5-15µm chuyển động bằng roi.
- + *Trichomonas* hình quả lê kích thước 5-12 x 5-6µm chuyển động được nhờ các roi.
- + Thể hoạt động của *Amip* kích thước 13-30µm chuyển động bằng chân giả.
- + Bào nang *Amip* hình tròn có vỏ dày bất màu vàng, kích thước trung bình 12µm bên trong có từ 2-4 nhân.
- + Bào nang *Giardia* hình bầu dục kích thước 10-14 x 7-9µm, bên trong có từ 2-4 nhân có thể thấy vết roi cuộn lại trong bào nang.

- Âm tính: Không thấy thể hoạt động, bào nang của đơn bào đường ruột.

Lưu ý: Trong trường hợp xét nghiệm lần đầu âm tính, nếu nghi ngờ có ký sinh trùng gây bệnh có thể xét nghiệm 2 mẫu phân tiếp theo trong vòng từ 7-10 ngày.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Phết lam quá dày hoặc quá mỏng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

205. Trứng giun, sán soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện trứng giun, sán trong phân bằng kỹ thuật soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nhận định trứng giun, sán dựa vào hình thể, kích thước, cấu tạo và tính chất bắt màu khi soi tươi.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- NaCl 0.9%
- Lugol 1%
- Axit ngậm lam
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Que lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)

- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 1 giờ.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Nhỏ dung dịch NaCL 9 ‰ và dung dịch Lugol 1% lên trên một lam kính.
2	Dùng que lấy một lượng phân (bao kín đầu que) hòa đều với giọt NaCL 9 ‰ đến khi có màu đục, làm tương tự đối với giọt Lugol 1%.
3	Đặt lá kính lên trên giọt dung dịch.
4	Quan sát kính hiển vi ở vật kính 10X- 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính:

- + Trứng giun đũa hình tròn hoặc bầu dục kích thước 35-50 x 45-75 μ m, ngoài cùng là lớp albumin xù xì bất màu vàng, vỏ dày, trong là khối nhân sẫm màu. Ngoài ra có thể còn gặp trứng giun đũa mất tầng albumin.
- + Trứng giun đũa không thụ tinh hình bầu dục kích thước 43- 47 x 85- 95 μ m. Vỏ mỏng ít xù xì bên trong có những tế bào hoàng thể.
- + Trứng giun móc hình bầu dục kích thước 40-60 μ m màu trong vỏ mỏng, trong là khối nhân phân chia từ 2-4 phần .
- + Trứng giun tóc hình bầu dục, kích thước 22-50 μ m giống hình quả cau, màu vàng vỏ dày, 2 cực có 2 nắp.
- + Trứng sán lá gan nhỏ bất màu vàng hình bầu dục một đầu có nắp một đầu có gai, kích thước 27-35 x 12-19 μ m.
- + Trứng sán lá gan lớn hình bầu dục kích thước lớn từ 130-150 X 63-90 μ m, màu vàng nhạt vỏ mỏng, một đầu có nắp.
- + Trứng sán lá phổi hình bầu dục màu vàng nâu sẫm kích thước lớn từ 80-120 X 50- 70 μ m, ở đầu có nắp trong trứng thấy có 1 đám tế bào.
- + Trứng sán dây hình tròn vỏ dày màu nâu sẫm kích thước từ 36-51 μ m.
- Âm tính: Không thấy trứng giun sán.

Lưu ý: Trong trường hợp xét nghiệm lần đầu âm tính, nếu nghi ngờ có ký sinh trùng gây bệnh có thể xét nghiệm 2 mẫu phân tiếp theo trong vòng từ 7-10 ngày.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Phết lam quá dày hoặc quá mỏng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

206. *Strongyloides stercoralis* (Giun lươn) ấu trùng soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện ấu trùng *S. stercoralis* trong phân bằng kỹ thuật soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Ấu trùng *S. stercoralis* được phát hiện dựa vào hình thể, kích thước và chuyển động khi soi tươi phân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- NaCl 0.9%
- Axit ngâm lam
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamén
- Que lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Nhỏ dung dịch NaCL 9 % lên lam kính.
2	Dùng que lấy một lượng phân (bao kín đầu que) hòa đều với giọt NaCL 9 % đến khi có màu đục.
3	Đặt lá kính lên trên giọt dung dịch.
4	Quan sát kính hiển vi ở vật kính 10X-40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính:
 - + Ấu trùng giun lươn có kích thước 16 x 220µm, chuyển động.

- + Phân biệt ấu trùng giun lươn và ấu trùng giun móc, mỏ: hình thể 2 loại ấu trùng khó có thể phân biệt, nhưng ấu trùng giun lươn xuất hiện ngay sau khi phân mới bài xuất còn ấu trùng giun móc, mỏ xuất hiện muộn (18- 24 giờ).
- Âm tính: Không thấy ấu trùng giun lươn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Phết lam quá dày hoặc quá mỏng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

207. *Demodex* soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện các loài *Demodex* gây bệnh ngoài da bằng kỹ thuật soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dưới tác dụng của KOH 10% biểu mô sừng mềm và mỏng do đó bộc lộ hình thái *Demodex*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Axit ngậm lam
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dầu thực vật
- KOH 10%
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dao cùn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)

- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: vẩy da, chất bã nhờn trên da
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Lấy bệnh phẩm: Dùng dao cùn đặt vuông góc với bề mặt da và song song với lam kính, sau đó cạo vẩy da ở vị trí được chỉ định. - Cạo sâu hơn cạo nắn da - Vị trí thường lấy: Mặt, đầu, lưng, ngực
2	Tập trung bệnh phẩm lên lam kính - Nhỏ KOH 10%, đậy lamén, ấn nhẹ để bệnh phẩm ngấm hoá chất và dàn đều. - Nếu bệnh phẩm là chất bã hòa tan vào 1-2 giọt dầu thực vật. Đọc sau vài phút.
3	Quan sát kính hiển vi vật kính 10X - 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Quan sát đặc điểm hình thể của *Demodex*
 - + Đối với *Demodex* trưởng thành, cơ thể chia làm 3 phần rõ: Đầu, ngực, đuôi. Chúng chỉ khác nhau ở phần đuôi (*D. folliculorum* đuôi dài, *D. brevis* đuôi ngắn). Còn phần đầu và ngực tương tự nhau
 - + Đánh giá độ tập trung của *Demodex*
 - + Nếu độ tập trung của *Demodex* > hoặc = 5 con/ vi trường ở độ phóng đại thấp (10X): *Demodex* là tác nhân gây bệnh.
 - + Nếu độ tập trung của *Demodex* < 5/ vi trường ở độ phóng đại thấp (10X) thì *Demodex* chưa hẳn là tác nhân gây bệnh.
- Âm tính: Không thấy *Demodex*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Bệnh nhân đã bôi thuốc diệt ký sinh trùng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lấy bệnh phẩm tại thương tổn không điển hình
- Bệnh phẩm lẫn nhiều chất bã và vảy da
- Bệnh phẩm quá dày hoặc quá mỏng
- Không lấy được bệnh phẩm ở sâu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

208. *Phthirus pubis* (Rận mu) soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện hình thái *Phthirus pubis* gây bệnh ngoài da bằng kỹ thuật soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dưới tác dụng của KOH 10% biểu mô sừng mềm và mỏng do đó bộc lộ hình thái *Phthirus pubis*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Axit ngậm lam
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- KOH 10%
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamén
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Lược mau
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Bàn xét nghiệm
- Kính lúp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: vảy da, sợi lông mu
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Lấy bệnh phẩm: Dùng kính lúp soi vùng lông và da mu - Chú ý vùng chân lông tìm rận mu - Ở thân lông có thể tìm thấy trứng rận
2	Dùng lược mau chải từ chân lông ra ngọn một cách nhẹ nhàng
3	Đặt tờ giấy trắng vuông góc vùng da mu và song song với lược mau
4	Dùng kính lúp soi vào tờ giấy trắng tìm rận hoặc có thể soi vào vùng da mu và thân lông tìm ấu trùng, trứng rận.
5	Nhỏ 1 giọt KOH 10%, đậy lamén
6	Quan sát kính hiển vi vật kính 10X - 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Quan sát đặc điểm hình thể của rận mu
 - + Cơ thể chia làm 3 phần rõ rệt: Đầu có vòi, ăng ten, mắt đơn, ngực có 3 đốt, bụng có 9 đốt.
 - + Rận trưởng thành có 3 cặp chân, ấu trùng có 4 cặp chân đối xứng nhau.
- Ngoài ra, trên tiêu bản có thể thấy trứng rận bám trên thân lông.
- Âm tính: Không thấy rận.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Bệnh nhân đã bôi thuốc diệt ký sinh trùng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lấy bệnh phẩm tại thương tổn không điển hình
- Bệnh phẩm quá dày hoặc quá mỏng
- Phân biệt với Rận gây bệnh ở súc vật: Chấy, Ghẻ và các loại Rận trên súc vật.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

209. *Sarcoptes scabies hominis* (Ghê) soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện hình thái *Sarcoptes scabies hominis* gây bệnh ngoài da bằng kỹ thuật soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dưới tác dụng của KOH 10% biểu mô sừng mềm và mỏng do đó bộc lộ hình thái *Sarcoptes scabies hominis*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Axit ngậm lam
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Xanh methylen
- KOH 10%
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dao cùn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)

- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Bàn xét nghiệm
- Kính lúp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: vẩy da
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Xác định luống ghẻ:
 - + Là đường chỉ nhỏ ngoằn ngoèo dài từ 3 đến 10 mm
 - + Có màu xám hoặc đen
 - + Cuối luống ghẻ là điểm phình to
 - + Lấy dao cùn cạo sâu vào da có thể bắt được cái ghẻ
- Ngoài ra nên lấy nhiều vị trí khác: kẽ tay, nếp lằn vú, vùng bẹn, mông, quỳ đầu.
- Làm test Burown ink
 - + Nhỏ 2-3 giọt Xanhmetylen vào điểm đầu đường hầm (rãnh ghẻ)
 - + Giữ yên trong thời gian 10 - 15 phút

- + Sau đó đem soi ngay dưới ánh đèn

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Xác định luống ghẻ
2	Dùng dao cùn cạo vào điểm phình to cuối luống ghẻ
3	Phết lên lam
4	Nhỏ 1 giọt KOH 10%, đậy lamén
5	Quan sát kính hiển vi vật kính 10X - 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Khi bắt gặp cái ghẻ hoặc trứng, ấu trùng hoặc chất thải của ghẻ. Cái ghẻ: Cơ thể không chia làm 3 phần rõ rệt. Hình dạng bầu dục, màu trắng xám, miệng ngắn, lưng gồ và không có mắt, đầu có vòi hút thức ăn.
 - + Con trưởng thành có 4 cặp chân, ấu trùng có 3 cặp chân, đối xứng nhau.
 - + Kích thước: Cái ghẻ: 330 - 250 μ m. Ghẻ đực : 220 - 150 μ m
- Âm tính: Không thấy ghẻ hoặc trứng, ấu trùng hoặc chất thải của ghẻ.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Bệnh nhân đã bôi thuốc diệt ký sinh trùng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Bệnh phẩm nhiều vảy da nên khó nhận định.
- Lấy thương tổn không điển hình và ít vị trí
- Phân biệt với các loại Ghẻ khác gây bệnh cho súc vật như: Ghẻ chó, mèo
- Đối với Ghẻ tăng sừng (Ghẻ Na-uy) có thể cạo bỏ lớp vảy da, sau đó dùng kính lúp soi vào vùng thương tổn để cạo vảy và đôi khi có thể thấy rất nhiều cái ghẻ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

210. *Trichomonas vaginalis* soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện *Trichomonas vaginalis* gây bệnh đường sinh dục bằng kỹ thuật soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Trichomonas vaginalis được phát hiện qua hình thể, kích thước, tính chất di động trong môi trường có NaCl 9% soi dưới kính hiển vi quang học.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- NaCl 0.9%
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại

- Kính hiển vi quang học
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Khí hư âm đạo
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Bệnh phẩm sau khi lấy hoà vào giọt nước muối sinh lý 0,9% đã nhỏ sẵn trên lam kính. Đặt lá kính soi ngay trên kính hiển vi quang học.
2	Soi ở vật kính 10X-40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Hình thể trùng roi giống hạt chanh, có 5 roi: 4 roi trước, 1 roi sau. Di động xoay tròn. Kích thước: 10-20µm x 5-12 µm.
- Âm tính: không thấy trùng roi.



4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Phết lam quá dày.
- Trùng roi chết nhanh ở nhiệt độ phòng.
- Phân biệt trùng roi với bọt khí, bạch cầu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

211. Vi nấm soi tươi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nhận định sơ bộ vi nấm bằng kỹ thuật soi tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nhận định sơ bộ vi nấm dựa vào hình thể, kích thước, cấu tạo và tính chất bắt màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Axit ngậm lam
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- NaCl 0.9%
- KOH 20%
- Mực tàu
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Dao tiểu phẫu
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)

- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bàn xét nghiệm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: máu, dịch cơ thể, mủ, đờm, phân, nước tiểu, dịch âm đạo, dịch họng, da, tóc, móng, mẫu sinh thiết.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Lấy bệnh phẩm cho lên lam kính, tùy từng loại bệnh phẩm sử dụng hóa chất khác nhau. - Bệnh phẩm da, tóc, móng: Lấy bệnh phẩm lên lam kính, nhỏ dung dịch KOH 20% lên trên bệnh phẩm. - Bệnh phẩm dịch tiết (lấy bằng que tăm bông), phân, mủ đặc, đờm đặc: Nhỏ NaCl 9‰ lên trên lam kính, lấy bệnh phẩm hòa lên trên giọt dung dịch đến khi đục. - Bệnh phẩm là dịch não tủy nghi ngờ nhiễm <i>Cryptococcus spp</i> làm tiêu bản bằng mực tàu. - Đối với bệnh phẩm là các chất dịch lỏng lấy trực tiếp bệnh phẩm lên lam kính.
2	Lấy lá kính đặt lên trên giọt dung dịch.
3	Quan sát kính hiển vi vật kính 10X - 40X.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Có tế bào nấm men hoặc sợi nấm.
 - + Tế bào nấm men hình tròn hoặc bầu dục kích thước 3- 5µm nảy chồi hoặc không.
 - + Thấy sợi nấm có vách ngăn hoặc không có vách ngăn.
 - + Tế bào nấm men có quang sáng khi làm tiêu bản mực tàu: Trả kết quả: Tế bào nấm men có quang sáng khi làm tiêu bản mực tàu (+), nghi ngờ *Cryptococcus sp*.
- Âm tính: Không thấy vi nấm.

Lưu ý: Nấm men trong các bệnh phẩm đường hô hấp (trừ nấm *Cryptococcus*), dịch dạ dày, phân, không được coi là căn nguyên gây bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Bệnh phẩm lấy không đúng vị trí tổn thương hoặc sai sót trong quá trình vận chuyển, bảo quản.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Đối với bệnh phẩm da, tóc, móng để thời gian ngắn chưa tan hết phải để thêm thời gian.
- Lấy quá nhiều mực tàu làm tiêu bản quá tối, phải pha loãng thêm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

212. *Vibrio cholerae* PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của vi khuẩn *Vibrio cholerae* trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của vi khuẩn *Vibrio cholerae* được nhân dòng bằng phản ứng khuếch đại chuỗi PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, sự có mặt của vi khuẩn *Vibrio cholerae* dựa được xác định dựa vào kích thước của sản phẩm PCR của đoạn ADN đặc trưng so với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh.
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN.
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C

- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm phân, chủng *Vibrio cholerae* phân lập, dịch cơ thể.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng vi khuẩn *Vibrio cholerae* chuẩn hoặc chủng *Vibrio cholerae* đã được định danh. Tiến hành tách chiết ADN của chứng dương cùng với các chứng âm và bệnh phẩm
- Tách chiết ADN bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công.

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μl sản phẩm PCR + 1.5 μl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút

- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Việc phân tích kết quả cần phải kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn và thực hiện theo đúng mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

213. *Vibrio cholerae* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của vi khuẩn *Vibrio cholerae* trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Cặp mồi và probe đặc hiệu cho đoạn ADN đặc trưng của vi khuẩn *Vibrio cholerae* được sử dụng để nhân dòng bằng kỹ thuật real-time PCR. Sự có mặt của vi khuẩn *Vibrio cholerae* được thể hiện thông qua tín hiệu huỳnh quang hiện thị trong phản ứng.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên tục
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Hóa chất tách theo máy tách tự động hoặc hóa chất tách tay
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Viên khử nhiễm Presept
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000μL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiết trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml Cái
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Tăm bông vô trùng
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy Realtime PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 μ l – 1000 μ l

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm phân, chủng *Vibrio cholerae* phân lập hoặc các bệnh phẩm dịch khác.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng nội kiểm Internal Control): bổ sung vào tất cả các mẫu tách chiết để đảm bảo hiệu quả tách chiết
- Chứng dương PC (Positive Control): sử dụng chủng *Vibrio cholerae* chuẩn hoặc chủng *Vibrio cholerae* đã được định danh. Tiến hành tách chiết cùng với các mẫu chứng âm và mẫu bệnh phẩm.
- Tách chiết ADN bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công.

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết

ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống master mix trong kit sinh phẩm sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Chia Master Mix vào mỗi ống phản ứng PCR (thể tích tùy theo loại sinh phẩm sử dụng):

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂ (25 mM)	4
3	Mồi xuôi	2
4	Mồi ngược	2
5	Probe huỳnh quang	1
6	H ₂ O	11
7	DNA khuôn	5
8	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

- Chuyển sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	95	5 phút	1
2	95	20 giây	45
	60	1 phút (đọc huỳnh quang)	
3	10	5 phút	1

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Thực hiện phân tích kết quả theo hướng dẫn của loại sinh phẩm hóa chất đang sử dụng.
- Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.

- Chứng âm không có đường huỳnh quang nào xuất hiện hoặc xuất hiện đồ thị huỳnh quang dưới đường giới hạn cơ bản.
- Chứng nội tại phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.
- Đường đồ thị huỳnh quang của mẫu có thể xuất hiện hoặc không xuất hiện trên đường giới hạn, căn cứ vào đó để kết luận kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của Internal Control (IC).
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc kết quả xét nghiệm cần phải kiểm tra chéo, tuân thủ đúng quy định đọc kết quả trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

214. *Neisseria gonorrhoeae* PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae* trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae* được nhân dòng bằng phản ứng khuếch đại chuỗi PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, sự có mặt của vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae* dựa được xác định dựa vào kích thước của sản phẩm PCR gen đặc trưng so với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C

- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch niệu đạo, cổ tử cung, hoặc dịch cơ thể có nghi ngờ có vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae* chuẩn hoặc chủng *Neisseria gonorrhoeae* đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Mẫu bệnh phẩm được tách chiết bằng máy hoặc bằng thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên
- Thể tích các thành phần trong phản ứng sẽ được chuẩn lại theo loại hoá chất, trình tự mồi sử dụng.

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.

- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μ l sản phẩm PCR + 1.5 μ l Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc kết quả xét nghiệm cần kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn và tuân thủ đúng mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

215. *Neisseria gonorrhoeae* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện gen đặc trưng của phức hợp vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae* trong mẫu bệnh phẩm đường sinh dục, nước tiểu, dịch phết hậu môn trực tràng và mủ lấy từ người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Sự hiện diện của *Neisseria gonorrhoeae* được biểu hiện bởi sự phát triển huỳnh quang của chất phát huỳnh quang FAM. Chứng nội chuẩn được bổ sung vào mẫu bệnh phẩm giúp kiểm soát các yếu tố gây ức chế phản ứng PCR. Tín hiệu chứng nội được phát hiện nhờ chất phát huỳnh quang HEX.

Định nghĩa: *Neisseria gonorrhoeae*: Vi khuẩn gây bệnh lậu

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml

- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: mẫu bệnh phẩm đường sinh dục, nước tiểu, dịch phết hậu môn trực tràng và mủ.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Bệnh phẩm dịch âm đạo, dịch niệu đạo, dịch phết trực tràng, mủ vết loét trong tăm bông: Bẻ đầu tăm bông vào tube vô trùng có sẵn 500µl dung dịch TE. Vortex mạnh 1 phút.
- Dùng 200µl mẫu đã xử lý để tách chiết. Nếu chưa tách chiết ngay, bảo quản mẫu ở -20°C (phải vortex mạnh trước khi tách chiết).
- Bệnh phẩm nước tiểu
- Thể tích nước tiểu phải > 15ml: Ly tâm ở 4500 vòng/phút trong 20 phút. Loại bỏ dịch nổi, thu cặn từ các ống rồi trộn vào chung một ống (phần cặn và dịch còn lại khoảng 500µl). Trộn đều, dùng 200µl cho tách chiết.
- Nếu chưa tách chiết ngay, bảo quản mẫu ở -20°C (phải trộn đều trước khi tách chiết)

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (µl)	25	50	100	200
Thể tích IS (µl)	2,5	5	10	20

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia 30 µl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 10 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 µl chứng dương và 10 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 40 µl.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:
- Màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện *N.gonorrhoeae*, màu Cy5 cho phát hiện biến thể porA và HEX cho phát hiện IS..
- Chu kỳ nhiệt:
 - + 1 chu kỳ: 37°C/2 phút
 - + 1 chu kỳ: 95°C/10 phút
 - + 45 chu kỳ: 95°C/5 giây
 - 60°C/40 giây – đọc sản phẩm
 - 72°C/20 giây

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.

- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

TT	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương (Ct trong khoảng từ 15 – 38)	+	±	Có giá trị
Chứng âm	-	+	Có giá trị

- Các trường hợp cần kiểm tra lại:

TT	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương	-	+	Cần kiểm tra lại
Chứng âm	+	-	Cần kiểm tra lại

4.2.2. Đọc kết quả

TT	Màu FAM	Màu Cy5	Màu HEX	KẾT QUẢ
1	+	-	±	Dương tính với <i>N.gonorrhoeae</i> porA variant
2	+	+	±	Dương tính với <i>N.gonorrhoeae</i>
3	-	+	±	Dương tính
4	-	-	+ (Ct<38)	Âm tính
5	-	-	+ (Ct>38)	Không có giá trị
6	-	-	-	Không có giá trị

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: ⇒ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trùng quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

216. *Neisseria gonorrhoeae* Real-time PCR hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của *Neisseria gonorrhoeae* trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm CT/NG Test
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Control (chứng dương+chứng âm)
- Control Diluent
- Các hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Giấy thấm không bụi
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm loại để bàn
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Nước tiểu, tăm bông phết dịch niệu đạo, âm đạo, dịch cổ tử cung, dịch phết hậu môn trực tràng.
- Bệnh phẩm được đựng trong lọ vô trùng chứa môi trường bảo quản có thể được vận chuyển ở 2 - 30°C.
- Bệnh phẩm cần chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 24 giờ.
- Mẫu nước tiểu trong môi trường bảo quản có thể ổn định trong 12 tháng ở 2-30°C; mẫu tăm bông trong môi trường bảo quản có thể ổn định trong 90 ngày ở 2-30°C
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Lấy hóa chất ra khỏi tủ lạnh, chuẩn bị mẫu, dán mã vạch
- Khởi động hệ thống, truy cập vào phần mềm.
- Thực hiện kiểm tra, bảo dưỡng vệ sinh hệ thống máy.
- Cho khay chứa mẫu vào vị trí trên máy.
- Tạo danh sách mẻ chạy. Danh sách tạo mẫu này không yêu cầu khi mạng LIS được kết nối.
- Chọn môi trường chạy cho mỗi mẫu, với mẫu nước tiểu, mẫu phết âm đạo, mẫu phết cổ tử cung, chọn kiểu xét nghiệm “CT/NG workflow”. Chọn “CT/NG cytology workflow” khi mẫu được chứa trong môi trường PreservCyt.
- Chọn xét nghiệm thể phụ “CT/NG” để báo cáo kết quả xét nghiệm cả CT/NG
- Chọn xét nghiệm thể phụ “CT” để báo cáo kết quả xét nghiệm CT
- Chọn xét nghiệm thể phụ “NG” để báo cáo kết quả xét nghiệm cả NG
- Nạp vật tư tiêu hao theo hướng dẫn của phần mềm.
- Nạp tất cả các thuốc thử theo hướng dẫn của phần mềm.

* **Lưu ý:** Không nạp chứng dương và chứng âm cùng với mẫu thử mà nạp cùng với thuốc thử.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Khuyếch đại CT/NG - DNA và đọc kết quả trên máy PCR tự động

- Sau khi dán xong, ấn nút Open trên máy để mở buồng ủ nhiệt, đặt đĩa đã dán miếng phủ vào. Ấn nút đóng lại, máy sẽ tự động chạy để khuyếch đại DNA.
- Sau khi kết thúc khuyếch đại, đèn sẽ chuyển sang màu da cam (khi chạy sẽ nhấp nháy đèn xanh)
- Đọc kết quả trên phần mềm, accept và in kết quả

Lấy đĩa PCR trong máy ra để tránh tình trạng máy bị nhiễm.

Bảo dưỡng cuối ngày: Hoàn tất công việc vệ sinh máy

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm:

- Kết quả chấp nhận được nếu Chứng âm và chứng dương: Valid
- Các mẫu sẽ không được chấp nhận nếu chứng âm hoặc chứng dương invalid.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

CT/NG Test	Báo cáo và Biện luận Kết quả
CT POS, NG POS	CT Dương tính, NG Dương tính
CT NEG, NG NEG	CT Âm tính, NG Âm tính
CT POS, NG NEG	CT Dương tính, NG Âm tính
CT POS, NG Invalid	CT Dương tính, NG không có giá trị → Thực hiện lại XN NG
CT NEG, NG POS	CT Âm tính, NG Dương tính
CT Invalid, NG POS	CT không có giá trị, NG Dương tính → Thực hiện lại XN CT
CT Invalid, NG NEG	CT không có giá trị, NG Âm tính → Thực hiện lại XN CT
CT NEG, NG Invalid	CT Âm tính, NG không có giá trị → Thực hiện lại XN NG
Invalid	Kết quả không có giá trị → Thực hiện lại XN CT và NG
Hỏng	Không có kết quả cho mẫu → Xem lại các thông báo còi và các hành động cần thực hiện được khuyến cáo trên phần mềm. Thực hiện xét nghiệm lại trên mẫu bệnh phẩm gốc.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: ⇒ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.

- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

$\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

$\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

$\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

$\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

217. *Chlamydia* Real-time PCR hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện gen đặc trưng của *Chlamydia trachomatis* (CT) trong mẫu bệnh phẩm lấy từ người bằng hệ thống máy PCR tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Khuếch đại DNA sử dụng mồi và mẫu dò đặc hiệu của CT/NG. Chứng nội chứa CT và NG DNA được thêm vào mẫu từ lúc chuẩn bị mẫu tự động và khuếch đại phát hiện đồng thời với mỗi mẫu để kiểm soát toàn bộ quá trình.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy PCR tự động tách chiết, khuếch đại và phát hiện và máy vi tính có cài đặt phần mềm.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nước tiểu, tăm bông phết dịch niệu đạo, âm đạo, dịch phết hậu môn trực tràng hoặc mủ của bệnh nhân, và được chứa trong các dung dịch bảo quản mẫu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Mẫu bệnh phẩm sau khi được lấy, cho vào lọ bảo quản. Tên bệnh nhân và mã vạch được dán trên lọ. Chúng ta có thể sử dụng trực tiếp các lọ đã chứa bệnh phẩm này để chạy trên máy hoặc hút khoảng 1-10 ml sang ống 13 ml để chạy. Lưu ý là ống 13 ml cũng phải ghi tên và dán mã vạch giống ống bảo quản ban đầu.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Cho một mẻ chạy hoàn chỉnh

a. *Tách chiết DNA và vận hành máy tách* (thực hiện theo hướng dẫn vận hành máy)

- Lấy hóa chất ra khỏi tủ lạnh, chuẩn bị mẫu, dán mã vạch
- Khởi động hệ thống, truy cập vào phần mềm.
- Thực hiện kiểm tra, bảo dưỡng vệ sinh hệ thống máy.
- Xét nghiệm có thể chạy với mẻ 1-22 mẫu, hoặc 1-94 mẫu cùng với hai chứng
- Cho khay chứa mẫu vào vị trí trên máy tách theo máy yêu cầu (đèn nhấp nháy các vị trí này). Sau đó ấn LOAD SAMPLES trên phần mềm để máy tự động kéo rack này vào.
- Tạo danh sách mẻ chạy bằng Work Order File. Danh sách tạo mẫu này không yêu cầu khi mạng LIS được kết nối.
- Chọn môi trường chạy cho mỗi mẫu, với mẫu nước tiểu, mẫu phết âm đạo, mẫu phết cổ tử cung, chọn kiểu xét nghiệm.
- Chọn xét nghiệm thể phụ “CT/NG” để báo cáo kết quả xét nghiệm cả CT/NG
- Chọn xét nghiệm thể phụ “CT” để báo cáo kết quả xét nghiệm CT
- Chọn xét nghiệm thể phụ “NG” để báo cáo kết quả xét nghiệm cả NG
- Nạp vật tư tiêu hao theo hướng dẫn của phần mềm.
- Nạp tất cả các thuốc thử theo hướng dẫn của phần mềm.

* **Lưu ý:** Không nạp chứng dương và chứng âm cùng với mẫu thử mà nạp cùng với thuốc thử.

- Nạp các thuốc thử chuẩn bị mẫu vào bình thuốc thử có mã vạch, sử dụng phương pháp “quét-quét-rót-đặt”:

+ Quét mã vạch chai thuốc thử

- + Quét mã vạch bình chứa thuốc thử
- + Rót thuốc thử vào bình chứa thuốc thử
- + Đặt bình đã được rót đầy thuốc thử vào giá mang thuốc thử.

* **Lưu ý:** Để đảm bảo chuyển chính xác MGP, quay hoặc lắc mạnh lọ MGP trong 1 phút trước khi rót vào bình chứa thuốc thử.

- Các bình chứa thuốc thử với hai kích cỡ 200 ml và 50 ml. Căn cứ theo hướng dẫn của phần mềm để chọn vị trí đặt bình thuốc thử cho phù hợp. Các mã vạch của bình chứa thuốc thử phải hướng về phía bên phải giá mang.

* **Lưu ý:** Các thuốc thử khuếch đại, chứng dương, chứng âm, chứng nội tại và dung dịch pha loãng chứng được nạp trực tiếp lên giá đựng thuốc thử và được máy tách quét tự động.

- Bắt đầu quá trình tách DNA bằng cách nhấp vào “START RUN”.
- Sau khi hoàn thành quá trình tách, nhấp “Unload” để tháo giá mang đĩa 96 giếng ra.
- Bật kín đĩa 96 giếng, chuyển đĩa sang máy phân tích Real-time PCR để chạy khuếch đại và phát hiện.

* **Lưu ý:** Quá trình khuếch đại và phát hiện phải được bắt đầu càng sớm càng tốt nhưng không quá 90 phút sau khi chấm dứt lượt chạy của máy tách.

b. Khuếch đại CT/NG - DNA và đọc kết quả trên máy Real-time PCR

- Sau khi dán xong, ấn nút Open trên máy để mở buồng ủ nhiệt, đặt đĩa đã dán miếng phủ vào. Ấn nút đóng lại, máy sẽ tự động chạy để khuếch đại DNA.
- Sau khi kết thúc khuếch đại, đèn sẽ chuyển sang màu da cam (khi chạy sẽ nhấp nháy đèn xanh)
- Đọc kết quả trên phần mềm, accept và in kết quả
- Lấy đĩa PCR trong máy ra để tránh tình trạng máy bị nhiễm.

c. Bảo dưỡng cuối ngày: Hoàn tất công việc vệ sinh máy.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Kết quả chấp nhận được nếu :

- Chứng âm: Valid
- Chứng dương: Valid

Các mẫu sẽ không được chấp nhận nếu chứng âm hoặc chứng dương invalid

4.2.2. Đọc kết quả

Kết quả thể hiện trên máy	Báo cáo và Biện luận Kết quả
CT POS, NG POS	CT Dương tính, NG Dương tính
CT NEG, NG NEG	CT Âm tính, NG Âm tính

Kết quả thể hiện trên máy	Báo cáo và Biện luận Kết quả
CT POS, NG NEG	CT Dương tính, NG Âm tính
CT POS, NG Invalid	CT Dương tính, NG không có giá trị → Thực hiện lại XN NG
CT NEG, NG POS	CT Âm tính, NG Dương tính
CT Invalid, NG POS	CT không có giá trị, NG Dương tính → Thực hiện lại XN CT
CT Invalid, NG NEG	CT không có giá trị, NG Âm tính → Thực hiện lại XN CT
CT NEG, NG Invalid	CT Âm tính, NG không có giá trị → Thực hiện lại XN NG
Invalid	Kết quả không có giá trị → Thực hiện lại XN CT và NG
Hỏng	Không có kết quả cho mẫu → Xem lại các thông báo còi và các hành động cần thực hiện được khuyến cáo trên phần mềm. Thực hiện xét nghiệm lại trên mẫu bệnh phẩm gốc.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Kết quả có thể âm tính giả trong các trường hợp sau:

a. *Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng:*

TT	Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng
1	Máu, các tế bào bạch cầu, dịch nhầy
2	Zovirax® Cream 5% (kem chống virus)
3	Kem bôi âm đạo CLOTRIMAZOLE (2%): thuốc chống nấm âm đạo

TT	Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng
4	Delfen® (bọt ngừa thai)
5	KY® Jelly (chất bôi trơn)
6	Lubrin® (thuốc bôi trơn âm đạo)
7	Metrogel-Vaginal®
8	Miconazole® 3 Suppository
9	Norforms® thuốc đạn khử mùi
10	Kem bôi âm đạo Terazol-3® 20gm
11	Vagi gard® Povidone-Iodine Concentrated Medicated Douche
12	Gel giữ ẩm Vagi gard®
13	Kem chống ngứa Vagisil®
14	Vagisil® Intimate Lubricant
15	Yeast gard® (homeopathic vaginal suppositories)

b. Môi trường:

- Sử dụng quá nhiều a-xít hypochlorous trong khử nhiễm phòng thí nghiệm.
- Sử dụng găng có bột talc khi thực hiện xét nghiệm.

5.2.2. Kết quả có thể dương tính giả trong các trường hợp sau:

- Có sự lây nhiễm chéo giữa các mẫu bệnh phẩm.
- Lây nhiễm các sản phẩm khuyếch đại từ lần phản ứng trước..

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

⇒ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

Chứng dương bị hỏng ⇒ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

218. *Neisseria meningitidis* PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* được nhân dòng bằng phản ứng khuếch đại chuỗi PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, sự có mặt của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* dựa được xác định dựa vào kích thước của sản phẩm PCR gen đặc trưng so với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Hóa chất tách theo máy tách tự động hoặc hóa chất tách tay
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Viên khử nhiễm Presept
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiết trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Tăm bông vô trùng
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (2 bộ/ người/ 600000XN/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ 600000XN/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết tự động
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C

- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm phân
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng vi khuẩn *Neisseria meningitidis* chuẩn hoặc chủng *Neisseria meningitidis* đã được định danh. Tách chiết mẫu chứng dương cùng với các mẫu bệnh phẩm và chứng âm.
- Thực hiện tách chiết ADN bằng máy tự động hoặc bằng thủ công.

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo quá trình pha Master Mix không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit PCR, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá

- Pha Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá và chia theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	95	5 phút	1
2	95	20 giây	35
	58	30 giây	
	72	1 phút	
3	72	15 phút	1
4	4	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μl sản phẩm PCR + 1.5 μl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, PC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy
- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có sản phẩm PCR, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có sản phẩm PCR, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có sản phẩm PCR, mẫu chứng âm không có sản phẩm, kết quả đó sẽ được sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc kết quả cần phải kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
2. Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
3. Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

219. *Neisseria meningitidis* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của *Neisseria meningitidis* trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, Nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Neisseris meningitidis* Real - TM (Ví dụ hoặc tương đương)
- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10μL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Các loại dịch (dịch não tủy, huyết tương)... được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Trước khi tách chiết cho 10 µl chứng nội (IC) vào từng giếng nhỏ bệnh phẩm.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chuẩn bị ống Master Mix với tỷ lệ các thành phần như hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Đảo trộn ống nhẹ nhàng khoảng 5 lần hoặc vortex sau đó ly tâm spindown.
- Chia 15 µl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 10 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 µl chứng dương và 10 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 25 µl.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.

- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:
- * Bộ mix-1 *S.pneumoniae*/H.influenza: Màu huỳnh quang FAM cho phát hiện *S.pneumoniae*, JOE/HEX/Cy3 cho phát hiện H.influenza.
- * Bộ mix-1 *N.meningitidis*/IC: Màu huỳnh quang FAM cho phát hiện IC, JOE/HEX/Cy3 cho phát hiện *N.meningitidis*.
- * Chu kỳ nhiệt: Thiết lập chu trình nhiệt trên thiết bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Rotor type instruments ¹					Plate type or modular instruments ²			
Stage	Temp, °C	Time	Fluorescence detection	Cycle repeats	Temp, °C	Time	Fluorescence detection	Cycle repeats
Hold	95	15 min	–	1	95	15 min	–	1
Cycling	95	10 s	–	45	95	10 s	–	45
	56	20 s	FAM(Green), JOE(Yellow)		56	30 s	FAM, JOE/HEX/Cy3	
	72	10 s	–		72	10 s	–	

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm:

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc thì phân tích kết quả. Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết. Xem xét kết quả nội kiểm. Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- Dương tính: khi giá trị Ct trên kênh JOE (Yellow)/HEX/Cy3 $\leq$ giá trị tới hạn tùy theo máy, Ct trên kênh FAM nằm trong giới hạn.
- Âm tính: khi giá trị Ct trên kênh FAM (Green) nằm trong giới hạn và không xuất hiện tín hiệu huỳnh quang trên kênh JOE (Yellow)/HEX/Cy3.
- Kết quả không hợp lệ nếu giá trị Ct của mẫu trên kênh JOE(Yellow)/HEX/Cy3 không xuất hiện trong khi giá trị Ct trên kênh FAM (Green) hoặc không có hoặc cao hơn giá trị giới hạn $\rightarrow$ Cần lặp lại xét nghiệm với mẫu như vậy.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình .
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

220. *Chlamydia* test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định kháng nguyên của *Chlamydia* có trong mẫu bệnh phẩm đường sinh dục bằng test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa vào nguyên lý miễn dịch sắc ký, sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng lại lipopolysacchride (LPS) của vi khuẩn *Chlamydia* để phát hiện sự có mặt của *Chlamydia* trong bệnh phẩm.

Định nghĩa:

- + Vạch C (Control line): Vạch chứng
- + Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ kit xét nghiệm Chlamydia Rapid Test Cassette
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tăm bông lấy bệnh phẩm vô trùng
- Mỏ vệt
- Panh
- Đồng hồ bấm giây
- Gạc
- Bút viết kính
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý

- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Bàn phụ khoa
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Đèn phụ khoa

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch cổ tử cung, dịch niệu đạo.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Chuẩn bị:

- Đối chiếu đúng bệnh nhân, tư vấn bệnh nhân cùng hợp tác để thực hiện kỹ thuật và hướng dẫn bệnh nhân bộc lộ vùng sinh dục.
- Để hộp test và thanh thử ở nhiệt độ phòng 10 - 15 phút trước khi làm xét nghiệm.
- Ghi tên tuổi bệnh nhân lên tube đựng bệnh phẩm.

4.1.2. Tiến hành lấy bệnh phẩm.

Đối với nam giới:

- Làm ẩm đầu tăm bông vô trùng và đưa vào sâu trong niệu đạo khoảng 2-3 cm. Chú ý dùng gạc lau sạch dịch mủ ở lỗ miệng sáo nếu chảy dịch mủ nhiều.
- Nhẹ nhàng xoay tròn đầu tăm bông,

- Lưu đầu tăm bông trong niêu đạo 5-10 giây, rồi rút nhẹ nhàng cho vào tube, cắm tube vào giá.

Đối với nữ giới

- Hướng dẫn bệnh nhân nằm tư thế sản khoa
- Dùng mỏ vịt đưa sâu vào âm đạo. Xoay mỏ vịt để định vị cổ tử cung.
- Dùng tăm bông thứ nhất: lau sạch dịch tiết cổ tử cung bỏ đi.
- Dùng tăm bông thứ hai, đưa tăm bông vào ống cổ tử cung khoảng 2cm, xoay nhẹ và lưu tăm bông 5 – 10 giây, rồi rút nhẹ nhàng cho vào tube, cắm tube vào giá.

4.1.3. Thực hiện kỹ thuật

- Tách chiết: giữ lọ thuốc thử 1 thẳng đứng, nhỏ 5 giọt thuốc thử (khoảng 300 µl) vào ống chiết. Cho tăm bông bệnh phẩm vào ống chiết, bóp đáy ống và xoay tăm bông 15 lần. Để yên trong 2 phút
- Trung hòa: giữ lọ thuốc thử 2 thẳng đứng, nhỏ 6 giọt thuốc thử 2 (khoảng 250 µl) vào ống chiết. Dung dịch chuyển thành đục. Bóp đáy ống và xoay tăm bông 15 lần cho đến khi dung dịch trở nên trong, màu xanh lá cây sang hoặc xanh da trời nhạt. Nếu tăm bông dính máu dung dịch chuyển màu vàng hoặc nâu. Để yên 1 phút.
- Ép tăm bông vào cạnh ống và rút tăm bông trong khi bóp ống sao cho lấy được càng nhiều dịch càng tốt. Lắp đầu ống nhỏ giọt vào ống chiết.
- Bỏ tăm bông vào thùng đựng chất thải lây nhiễm (thùng rác vàng).
- Lấy thanh thử ra khỏi hộp bảo vệ, ghi tên tuổi bệnh nhân lên thanh thử.
- Nhỏ 3 giọt (100 µl) mẫu đã tách chiết vào giếng thử trên thanh thử đã chuẩn bị sẵn.
- Đọc kết quả vào phút thứ 10 phút. Không đọc kết quả sau 20 phút

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C:

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch kiểm tra Control (C)
- Dương tính: có cả 2 vạch Control (C) và Test (T)
- Không giá trị: không có vạch Control (C). Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ ☐ thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Bệnh phẩm chưa cho vào dung dịch tách chiết tế bào có thể giữ ở nhiệt độ phòng (15-30°C) trong 4-5 giờ hoặc trong tủ lạnh 2 - 8°C trong 24 giờ. Không được đông băng. Bệnh phẩm phải đưa về nhiệt độ phòng (15-30°C) trước khi làm xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn, thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch Control. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Dịch nhầy ở niệu đạo (nam giới) và ở cổ tử cung (nữ giới) cần được lau sạch để tránh cho kết quả dương tính giả.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

221. *Chlamydia* Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể IgM hoặc IgG hoặc IgA đối với *Chlamydia* trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

1.3. Định nghĩa

Chlamydia Ab: Kháng thể kháng *Chlamydia*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm ELISA *Chlamydia* IgG/IgM/IgA
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 5-15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml

- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất..

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Chlamydia trachomatis* IgA (Ví dụ)

Các bước	Xét nghiệm định tính IgA kháng <i>Chlamydia trachomatis</i>
1	Đề sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng (20-25°C). Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Phân phối 100 µL mẫu chứng/mẫu chuẩn và mẫu thử đã pha loãng (1+100 như mục 8.1) vào giếng tương ứng. Giếng A1 dành cho giếng trắng, B1 chứng âm, C1 và D1 Cut-off, E1 Chứng dương. Phủ các giếng bằng giấy bạc được cung cấp trong bộ kit.
5	Ủ trong 1 giờ ± 5 phút ở 37 ± 1°C trong tủ ấm Memmert INB – 400 (HDM.VRMD 12).
6	Khi ủ xong, bỏ miếng giấy bạc khỏi khay và rửa trên máy tự động. Thời gian ngâm giữa mỗi bước rửa > 5 giây bằng máy rửa Thermo Fisher scientific VSM.VRMD.XN.019. Sau bước rửa cuối cùng, cẩn thận loại bỏ chất lỏng còn lại trong giếng bằng cách úp và đập nhẹ khay trên khăn giấy trước khi sang bước tiếp theo.
7	Phân phối 100 µL chất cộng hợp vào tất cả các giếng, trừ giếng A1 dành cho giếng trắng.
8	Ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (20-25 °C), tránh tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời.
9	Lặp lại bước 8.2.6
10	Phân phối 100 µL dung dịch cơ chất TMB vào tất cả các giếng
11	Ủ chính xác 15 phút ở nhiệt độ phòng (20-25°C) trong chỗ tối. Dung dịch chuyển màu xanh dương do phản ứng enzym xảy ra.

Các bước	Xét nghiệm định tính IgA kháng <i>Chlamydia trachomatis</i>
12	Phân phối 100 µL dung dịch dừng phản ứng vào các giếng theo đúng thứ tự và tốc độ như đối với cơ chất TMB, sau đó phản ứng xảy ra làm cho màu xanh dương chuyển thành màu vàng.
13	Đo độ hấp thụ ở bước sóng 450/620 nm trong vòng 30 phút sau khi thêm dung dịch dừng phản ứng.
Điều chỉnh giá trị đọc được của máy đọc tấm vi giếng ELISA về 0 với giếng trắng. Nếu - vì lý do kỹ thuật - máy đọc tấm vi giếng ELISA không thể điều chỉnh giá trị về 0 bằng giếng trắng thì nên lấy tất cả các giá trị đo được trừ đi giá trị của giếng trắng này, để có được kết quả đáng tin cậy! Đo độ hấp thụ của tất cả các giếng ở bước sóng 450 nm và ghi lại các giá trị độ hấp thụ cho từng mẫu chứng/ mẫu chuẩn và mẫu thử vào sơ đồ tấm vi giếng. Khuyến cáo nên đo hai bước sóng sử dụng bước sóng tham chiếu là 620 nm.	

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm:

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Để một xét nghiệm được xem là hợp lệ, phải tuân thủ nghiêm ngặt những hướng dẫn sử dụng này và phải đáp ứng được các tiêu chí sau đây:
 - + Giếng trắng: $< 0,100$
 - + Chứng âm: Giá trị hấp thụ Giá trị hấp thụ $< 0,200$ và $< \text{Cut-off}$
 - + Chứng Cut-off: Giá trị hấp thụ $0,150 - 1,300$
 - + Chứng dương: Giá trị hấp thụ $> \text{Cut-off}$
- Tính giá trị độ hấp thụ trung bình của các mẫu lặp lại, nếu có.
- Nếu các tiêu chí trên không được đáp ứng, xét nghiệm này là không hợp lệ và phải làm lại.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Tính toán kết quả:

- Giá trị Cut-off là trung bình cộng của các giá trị độ hấp thụ đo được từ chứng Cut-off. Ví dụ: Giá trị độ hấp thụ chứng Cut-off $0,44 + \text{giá trị độ hấp thụ chứng Cut-off } 0,42 = 0,86 / 2 = 0,43$ Cut-off = $0,43$
 - Kết quả theo đơn vị [NTU]
 - Giá trị độ hấp thụ (trung bình) mẫu $\times 10 / \text{Cut-off} = [\text{Đơn vị NovaTec} = \text{NTU}]$
- Ví dụ: $(1,591 \times 10) / 0,43 = 37 \text{ NTU}$ (Đơn vị)

Cut off	10 NTU	Giải thích kết quả
Dương tính	>11 NTU	Có kháng thể kháng mầm bệnh. Đã có sự tiếp xúc với kháng nguyên (vắc xin tương ứng với mầm bệnh).
Không xác định	9-11 NTU	Không thể phát hiện rõ ràng các kháng thể kháng mầm bệnh. Cần lặp lại thử nghiệm với mẫu mới sau 2 đến 4 tuần. Nếu kết quả là không rõ ràng một lần nữa, mẫu được đánh giá là âm tính
Âm tính	<9 NTU	Mẫu không chứa kháng thể kháng mầm bệnh. Không chắc chắn về việc có sự tiếp xúc với kháng nguyên (vắc xin tương ứng với mầm bệnh) trước đó hay không.
Việc chẩn đoán bệnh truyền nhiễm không nên dựa trên một kết quả xét nghiệm duy nhất. Một chẩn đoán chính xác cần xem xét tiền sử lâm sàng, triệu chứng cũng như dữ liệu huyết thanh học. Ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch và trẻ sơ sinh, dữ liệu huyết thanh học chỉ có giá trị hạn chế.		

Loại kháng thể và tình trạng nhiễm trùng

Huyết thanh học	Ý nghĩa
IgM	Đặc điểm của đáp ứng kháng thể giai đoạn sơ cấp. Hiệu giá IgM cao với hiệu giá IgG thấp: → gợi ý tình trạng đang nhiễm hoặc mới nhiễm. Hiếm: → IgM tồn tại dai dẳng
IgG	Đặc điểm của đáp ứng kháng thể giai đoạn thứ cấp có thể tồn tại đến vài năm. Hiệu giá IgG cao với hiệu giá IgM thấp: → có thể chỉ ra đã nhiễm bệnh trước đó.
IgA	Được tạo ra trong lớp lót niêm mạc khắp cơ thể (⇒ hàng rào bảo vệ) Thường được tạo ra trong quá trình nhiễm bệnh

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chủng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

222. *Chlamydia* Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định các kháng thể kháng *Chlamydia* trong huyết thanh/ huyết tương của người bằng hệ thống máy ELISA tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể kháng *Chlamydia*.

Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể kháng *Chlamydia* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Chlamydia* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể kháng *Chlamydia*
- Bộ sinh phẩm xác định kháng thể kháng *Chlamydia* bao gồm:
 - + Vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu
 - + Mẫu chứng, mẫu chuẩn
 - + Dung dịch pha loãng mẫu
 - + Dung dịch rửa đậm đặc
 - + Kháng thể gắn enzyme
 - + Cơ chất/ chất tạo màu
 - + Dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy

- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- Khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sỹ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C- 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 1 giờ (60 phút)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

- Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoạch Âm tính
 - + Hoạch Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Thông báo tới Bác sỹ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

223. *Chlamydia* PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của vi khuẩn *Chlamydia* trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của vi khuẩn *Chlamydia* được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, sự có mặt của vi khuẩn *Chlamydia* được xác định dựa vào kích thước của sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng so với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C

- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Nước tiểu đầu dòng, dịch niệu đạo, dịch cổ tử cung.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 5 giờ

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng vi khuẩn Chlamydia chuẩn hoặc chủng Chlamydia đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết ADN bằng máy tự động hoặc bằng thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình PCR được thực hiện đúng; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μl sản phẩm PCR + 1.5 μl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút

- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định đọc kết quả ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

224. *Chlamydia* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện gen đặc trưng của vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* trong mẫu bệnh phẩm đường sinh dục, nước tiểu, dịch phết hậu môn trực tràng và mủ lấy từ người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: mẫu bệnh phẩm đường sinh dục, nước tiểu, dịch phết hậu môn trực tràng và mủ.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bệnh phẩm dịch âm đạo, dịch niệu đạo, dịch phết trực tràng, mủ vết loét trong tăm bông:

- Bẻ đầu tăm bông vào tube vô trùng có sẵn 500µl dung dịch TE. Vortex mạnh 1 phút.
- Dùng 200µl mẫu đã xử lý để tách chiết. Nếu chưa tách chiết ngay, bảo quản mẫu ở -20°C (phải vortex mạnh trước khi tách chiết).

Bệnh phẩm nước tiểu

- Thể tích nước tiểu phải > 15ml: Ly tâm ở 4500 vòng/phút trong 20 phút. Loại bỏ dịch nổi, thu cặn từ các ống rồi trộn vào chung một ống (phần cặn và dịch còn lại khoảng 500µl). Trộn đều, dùng 200µl cho tách chiết.
- Nếu chưa tách chiết ngay, bảo quản mẫu ở -20°C (phải trộn đều trước khi tách chiết)

- 4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (µl)	25	50	100	200
Thể tích IS (µl)	2,5	5	10	20

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia 30 µl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 10 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 µl chứng dương và 10 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 40 µl.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:
- Màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện *N.gonorrhoeae*, màu Cy5 cho phát hiện biến thể porA và HEX cho phát hiện IS..
- Chu kỳ nhiệt:

+ 1 chu kỳ: 37°C/2 phút

+ 1 chu kỳ: 95°C/10 phút

+ 45 chu kỳ: 95°C/5 giây

60°C/40 giây – đọc sản phẩm

72°C/20 giây

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

TT	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương (Ct trong khoảng từ 15 – 38)	+	±	Có giá trị
Chứng âm	-	+	Có giá trị

- Các trường hợp cần kiểm tra lại:

TT	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương	-	+	Cần kiểm tra lại
Chứng âm	+	-	Cần kiểm tra lại

4.2.2. Đọc kết quả

TT	Màu FAM	Màu HEX	KẾT QUẢ
1	+	±	Dương tính với <i>C. trachomatis</i>
2	-	+	Âm tính với <i>C. trachomatis</i>
3	-	+ (Ct>38)	Không có giá trị
4	-	-	Không có giá trị

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: ⇒ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử ⇒ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu (Ct > 36): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
⇒ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

⇒ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

⇒ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình .
- Chứng dương bị hỏng ⇒ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

225. *Clostridium difficile* miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính cả độc tố A và độc tố B của *Clostridium difficile* (*C. difficile*) trong phân. Xét nghiệm này là một công cụ hữu ích để hỗ trợ phát hiện nhiễm trùng *C. difficile* bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính, định lượng kháng thể IgM dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm *C. difficile* Toxin A & B ELISA
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm

- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân. Cần thu thập tối thiểu 1-2 mL mẫu phân lỏng hoặc 1-2g mẫu phân rắn. Nếu mẫu phân được thu thập và xét nghiệm trong cùng ngày, thì được phép bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, nếu lâu hơn cần bảo quản trong điều kiện đông lạnh (-20°C). Tránh đông lạnh và rã đông quá 3 lần.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Cần pha loãng mẫu bệnh nhân theo tỷ lệ 1:5 với đệm chiết phân (1x) trước khi xét nghiệm.
- + Ghi nhãn ống nghiệm (12x75 mm) hoặc lọ nhựa 4 ml.
- + Với mẫu phân rắn, lấy một lượng tương đương khoảng 250mg hoặc 350 μ L đối với phân lỏng. Hòa trộn mẫu phân rắn/lỏng bằng 1 mL đệm chiết phân và trộn đều trên máy trộn xoáy.
- + Ly tâm mẫu phân đã pha loãng ở tốc độ 3000 vòng/phút (800 - 1500 g) trong 5-10 phút. Có thể sử dụng trực tiếp phần dịch nổi trong xét nghiệm. Thay vì ly tâm, hãy để các mẫu pha loãng lắng xuống và lắng trong 30 phút và lấy phần dịch nổi trong để thử nghiệm.

Lưu ý: Nếu quy trình thử nghiệm được thực hiện trên hệ thống ELISA tự động, phần dịch nổi phải không có hạt bằng cách ly tâm mẫu.

- Mẫu này có thể được bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong tối đa ba (3) ngày và dưới -20°C để bảo quản lâu hơn. Tránh chu kỳ đông lạnh và rã đông hơn 3 lần.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *C. difficile* Toxin A & B ELISA

Các bước	Nội dung
1	Để sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Nhỏ 100 μ L mỗi mẫu chứng âm, chứng dương có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào mỗi giếng. A1, B1 cho chứng âm, C1, D1 cho chứng dương, E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2....
5	Ủ 60 phút ($\pm$ 5 phút) ở nhiệt độ phòng.
6	Rửa tấm 5 lần với 350 μ L – 400 μ L /giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.

Các bước	Nội dung
7	Nhỏ 100 µl dung dịch kháng thể Toxin AB Tracer vào mỗi giếng. Trộn bằng cách gõ nhẹ vào đĩa.
8	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.
9	Rửa tám 5 lần với 350 µl – 400 µl /giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tám bằng giấy thấm.
10	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu HRP Substrate vào mỗi giếng.
11	Ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.
12	Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tám.
13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 450 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm, ví dụ 650 nm) bằng máy đọc ELISA.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Tính độ hấp phụ trung bình cho mỗi mẫu chứng âm và chứng dương.
 - + Chứng dương tính phải cho kết quả đọc OD trung bình $> 0,6$.
 - + Chứng âm tính phải cho kết quả đọc OD trung bình $< 0,18$.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Tính giá trị ngưỡng:
 - + Ngưỡng dương tính = $1,1 \times (\text{trung bình của chứng âm tính} + 0,10)$
 - + Ngưỡng âm tính = $0,9 \times (\text{trung bình của chứng âm tính} + 0,10)$
- Phiên giải kết quả:
 - + Dương tính: OD mẫu bệnh nhân $>$ Ngưỡng dương tính. Đề khẳng định chắc chắn mẫu dương tính, nên lặp lại xét nghiệm.
 - + Âm tính: OD mẫu bệnh nhân $<$ Ngưỡng âm tính.
 - + Không rõ ràng: OD mẫu bệnh nhân nằm giữa Ngưỡng dương tính và Ngưỡng âm tính. Trong trường hợp này cần làm lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chủng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

226. *Clostridium difficile* độc tố A và B miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính *Clostridium difficile* (*C. difficile*) toxin A và toxin B trong mẫu phân sử dụng kỹ thuật ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay - Xét nghiệm huỳnh quang liên kết enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện định tính *Clostridium difficile* toxin A và toxin B dựa trên nguyên lý bánh kẹp gắn miễn dịch enzym 2 bước bằng kỹ thuật ELFA. Cường độ huỳnh quang tỷ lệ với nồng độ độc tố A và B hiện diện trong mẫu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm *C. difficile* Toxin A & B
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư tiêu hao cần thiết tùy theo từng loại sinh phẩm
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 10 ml
- Panh
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (2 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân. Cần thu thập tối thiểu 1-2 mL mẫu phân lỏng hoặc 1-2g mẫu phân rắn. Nếu mẫu phân được thu thập và xét nghiệm trong cùng ngày, thì được phép bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, nếu lâu hơn cần bảo quản trong điều kiện đông lạnh (-20°C). Tránh đông lạnh và rã đông quá 3 lần.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 90 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Phân lỏng: Trộn đều lọ phân. Hút 200 µl phân lỏng vào ống sạch ly tâm. Hút 1000 µl dung dịch pha loãng R1 vào ống ly tâm. Trộn đều dung dịch bằng cách hút vào và ra bằng pipet. Vortex trộn đều. Ly tâm 5 phút ở 2-250C ít nhất 12000g.
- Phân nhão hoặc rắn: hòa đều 200 mg phân nhão hoặc rắn vào 200 µl nước cất đã cho vào ống ly tâm. Dùng que gỗ sạch trộn đều. Hút 1000 µl dung dịch pha loãng R1 vào ống ly tâm. Trộn đều dung dịch bằng cách hút vào và ra bằng pipet. Vortex trộn đều. Ly tâm 5 phút ở 2-250C ít nhất 12000g.
- Đối với mẫu chứng và chuẩn: hút 200 µl vào ống sạch ly tâm. Hút 1000 µl dung dịch pha loãng R1 vào ống ly tâm. Trộn đều dung dịch bằng cách hút vào và ra bằng pipet. Vortex trộn đều.
- Sử dụng 300 µl phần nước nổi (Nếu có lớp mỡ váng nổi ở trên cần tránh hút dung dịch ngay phía dưới) cho test VIDAS C. difficile Toxin A&B.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *C. difficile* Toxin A & B

Các bước	Nội dung
1	Lấy bộ kit ra khỏi tủ lạnh, lấy đủ số test cần dùng để ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi sử dụng.
2	Kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn:. + Chuẩn phải được thực hiện mỗi khi mở lô hóa chất mới và 14 ngày/lần. + Chất chuẩn S1 phải được thực hiện đúng đồng thời. Giá trị phải nằm trong dải RFV (giá trị huỳnh quang tương đối). Nếu không nằm trong dải này cần phải chạy chuẩn lại.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên thì tiến hành chạy chuẩn, chứng và mẫu
4	Chạy mẫu, chứng, chuẩn theo các bước sau:
5	Hút 300 µl mẫu chuẩn, chứng, mẫu đã chuẩn bị như trên vào thanh test VIDAS C. Difficile Toxin A&B (Nếu chuẩn là S1 và chạy đúng đồng thời trên 1 lần chạy, chứng dương là C1, C3 và chứng âm là C2).
6	Đặt CDAB SPRs và các thanh CDAB vào máy. Kiểm tra để đảm bảo màu nhãn với mã xét nghiệm trên SPRs và các thanh hóa chất là trùng nhau.

Các bước	Nội dung
7	Xét nghiệm như mô tả trong hướng dẫn sử dụng máy. Các bước xét nghiệm tự động trên máy.
8	Xét nghiệm hoàn thành trong khoảng 75 phút. Lấy các thanh SPRs và hóa chất ra khỏi máy, loại bỏ vào thùng chứa phù hợp.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt yêu cầu.
- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm, xem xét độ lặp lại, độ tái lập...
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Hệ thống VIDAS C. difficile Toxin A&B tính toán RFV (giá trị huỳnh quang tương đối) sau 2 lần đo đọc dải thuốc thử (đọc nền trước khi SPR được đưa vào cơ chất và đọc lần 2 sau khi ủ cơ chất với enzyme còn lại bên trong SPR). RFV là hiệu số của kết quả cuối trừ đi số đọc nền.
- Xét nghiệm VIDAS C. difficile Toxin A&B tính toán kết quả dựa trên RFV được xác định theo cách tính sau:

$$\text{Giá trị xét nghiệm} = (\text{Giá trị RFV bệnh nhân} / \text{RFV chuẩn})$$

Diễn giải kết quả

Giá trị xét nghiệm (TV)	Phiên giải kết quả
< 0.13	Âm tính
$0.13 \leq VT < 0.37$	Nghi ngờ
≥ 0.37	Dương tính

- Khuyến cáo kiểm tra lại kết quả nghi ngờ bằng cách xét nghiệm mẫu thử hoặc lấy mẫu mới xét nghiệm trong vòng 2 tuần khi có dấu hiệu lâm sàng và tiền sử bệnh nhân. Nếu kết quả vẫn không xác định khuyến cáo xét nghiệm bằng phương pháp khác

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

227. *Clostridium difficile* độc tố A và B miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm để phát hiện định tính *Clostridium difficile* toxin A và toxin B trong mẫu phân bằng kỹ thuật enzyme liên kết huỳnh quang (ELFA).

1.3. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật enzyme liên kết huỳnh quang (ELFA). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua bước phát hiện huỳnh quang cuối cùng. Cường độ huỳnh quang tỷ lệ với nồng độ độc tố A và B hiện diện trong mẫu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *C. Difficile* Toxin A&B (VD hoặc tương đương).

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube ly tâm
- Sample Cup
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Dụng cụ lấy bệnh phẩm
- Vật tư thay thế khác
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *C. Difficile* Toxin A&B. (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Lấy bộ kit ra khỏi tủ lạnh, lấy đủ số test cần dùng để ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi sử dụng.
2	Kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn:. + Chuẩn phải được thực hiện mỗi khi mở lô hóa chất mới và 14 ngày/lần. + Chất chuẩn S1 phải được thực hiện đúng đồng thời. Giá trị phải nằm trong dải RFV (giá trị huỳnh quang tương đối). Nếu không nằm trong dải này cần phải chạy chuẩn lại.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên thì tiến hành chạy chuẩn, chứng và mẫu
4	Chạy mẫu, chứng, chuẩn theo các bước sau:
5	Chuẩn bị mẫu: Phân lỏng: Trộn đều lọ phân. Hút 200 µl phân lỏng vào ống sạch ly tâm. Hút 1000 µl dung dịch pha loãng R1 vào ống ly tâm. Trộn đều dung dịch bằng cách hút vào và ra bằng pipet. Vortex trộn đều. Ly tâm 5 phút ở 2-25°C ít nhất 12000g. Phân nhão hoặc rắn: hòa đều 200 mg phân nhão hoặc rắn vào 200 µl nước cất đã cho vào ống ly tâm. Dùng que gỗ sạch trộn đều. Hút 1000 µl dung dịch pha loãng R1 vào ống ly tâm. Trộn đều dung dịch bằng cách hút vào và ra bằng pipet. Vortex trộn đều. Ly tâm 5 phút ở 2-25°C ít nhất 12000g. Đối với mẫu chứng và chuẩn: hút 200 µl vào ống sạch ly tâm. Hút 1000 µl dung dịch pha loãng R1 vào ống ly tâm. Trộn đều dung dịch bằng cách hút vào và ra bằng pipet. Vortex trộn đều. Sử dụng 300 µl phần nước nổi (Nếu có lớp mỡ váng nổi ở trên cần tránh hút dung dịch ngay phía dưới) cho test <i>C. Difficile</i> Toxin A&B.
6 7	Hút 300 µl mẫu chuẩn, chứng, mẫu đã chuẩn bị như trên vào thanh test <i>C. Difficile</i> Toxin A&B (Nếu chuẩn là S1 và chạy đúng đồng thời trên 1 lần chạy, chứng dương là C1, C3 và chứng âm là C2).
8	Đặt CDAB SPRs và các thanh CDAB vào máy. Kiểm tra để đảm bảo màu nhãn với mã xét nghiệm trên SPRs và các thanh hóa chất là trùng nhau.
9	Xét nghiệm như mô tả trong hướng dẫn sử dụng máy. Các bước xét nghiệm tự động trên máy.
10	Xét nghiệm hoàn thành trong khoảng 75 phút. Lấy các thanh SPRs và hóa chất ra khỏi máy, loại bỏ vào thùng chứa phù hợp.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm

Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

- + Hệ thống máy tính toán RFV (giá trị huỳnh quang tương đối) sau 2 lần đo đọc dải thuốc thử (đọc nền trước khi SPR được đưa vào cơ chất và đọc lần 2 sau khi ủ cơ chất với enzyme còn lại bên trong SPR). RFV là hiệu số của kết quả cuối trừ đi số đọc nền.
- + Xét nghiệm tính toán kết quả dựa trên RFV được xác định theo cách tính sau:
 - Giá trị xét nghiệm = (Giá trị RFV bệnh nhân/RFV chuẩn)

Diễn giải kết quả

Giá trị xét nghiệm (TV)	Phiên giải kết quả
< 0.13	Âm tính
$0.13 \leq VT < 0.37$	Nghi ngờ
≥ 0.37	Dương tính

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường:
 - + Khuyến cáo kiểm tra lại kết quả nghi ngờ, nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì đánh giá là: Không xác định.
 - + Hoặc lấy mẫu mới xét nghiệm trong vòng 2 tuần khi có dấu hiệu lâm sàng và tiền sử bệnh nhân. Nếu kết quả vẫn không xác định khuyến cáo xét nghiệm bằng phương pháp khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

228. *Clostridium difficile* GDH miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm định tính phát hiện kháng nguyên *Clostridium difficile*, glutamate dehydrogenase (*C.difficile* GDH), chứng tỏ sự hiện diện của *C. difficile* trong mẫu phân từ những người nghi ngờ nhiễm *C.difficile* (CDI). Kết quả cần được xem xét với việc kết hợp với lịch sử bệnh nhân bằng kỹ thuật enzyme liên kết huỳnh quang (ELFA).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật enzyme liên kết huỳnh quang (ELFA). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua bước phát hiện huỳnh quang cuối cùng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

Bộ sinh phẩm *C. difficile* GDH (VD hoặc tương đương)

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube ly tâm
- Sample Cup
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Dụng cụ lấy bệnh phẩm
- Vật tư thay thế khác
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy miễn dịch tự động Vidas (VD hoặc tương đương)
- Máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Máy ly tâm thường
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 µl, 200 µl và 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm *C. difficile* GDH (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Lấy bộ kit ra khỏi tủ lạnh, lấy đủ số test cần dùng để ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi sử dụng.
2	Kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn:. + Chuẩn phải được thực hiện mỗi khi mở lô hóa chất mới và 28 ngày/lần. + Chất chuẩn S1 phải được thực hiện đúng đồng thời. Giá trị phải nằm trong dải RFV (giá trị huỳnh quang tương đối). Nếu không nằm trong dải này cần phải chạy chuẩn lại.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên thì tiến hành chạy chuẩn, chứng và mẫu
4	- Chuẩn bị mẫu: Phân lỏng: Trộn đều lọ phân. Hút 200 µl phân lỏng vào ống sạch ly tâm. Hút 1000 µl dung dịch tiền xử lý R1 vào ống ly tâm. Trộn đều dung dịch bằng cách hút trộn bằng pipet. Vortex trộn đều. Ly tâm 10 phút ở 2-25°C ít nhất 3000g. Phân nhão hoặc rắn: hòa đều 200 mg phân nhão hoặc rắn vào 200 µl nước cất đã cho vào ống ly tâm. Dùng que gỗ sạch trộn đều. Hút 1000 µl dung dịch tiền xử lý R1 vào ống ly tâm. Trộn đều dung dịch bằng cách hút trộn bằng pipet. Vortex trộn đều. Ly tâm 10 phút ở 2-25°C ít nhất 3000g. Đối với mẫu chứng và chuẩn: hút 200 µl vào ống sạch ly tâm. Hút 1000 µl dung dịch tiền xử lý R1 vào ống ly tâm. Trộn đều dung dịch bằng cách hút trộn bằng pipet. Vortex trộn đều. - Sử dụng 300 µl phần nước nổi. Đối với mẫu phân đã xử lý, nếu có lớp mỡ váng nổi ở trên cần hút dung dịch ngay phía dưới lớp bề mặt.
4	Chạy mẫu, chứng, chuẩn theo các bước sau từ 5 - 9
5	Hút 300 µl mẫu chuẩn, chứng, mẫu đã chuẩn bị như trên vào thanh test <i>C. Difficile</i> GDH (Nếu chuẩn là S1 và chạy đúng đồng thời trên 1 lần chạy, chứng âm và chứng dương là C1, C2).
6	Đặt SPRs “GDH” và các thanh “GDH” vào máy. Kiểm tra để đảm bảo màu nhãn với mã xét nghiệm trên SPRs và các thanh hóa chất là trùng nhau.
7	Xét nghiệm như mô tả trong hướng dẫn sử dụng máy. Các bước xét nghiệm tự động trên máy.
8	Xét nghiệm hoàn thành trong khoảng 50 phút. Lấy các thanh SPRs và hóa chất ra khỏi máy, loại bỏ vào thùng chứa phù hợp.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn được nêu trong hướng dẫn sử dụng mẫu chứng đính kèm. Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Đọc kết quả và nhận định kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả thu được của xét nghiệm được biểu thị ở giá trị RFV (Giá trị huỳnh quang tương đối) được tính bằng cách lấy kết quả của lần đọc sau cùng trừ đi kết quả của lần đọc nền. Kết quả RFV của bệnh nhân được phiên giải như sau:

$$\text{Giá trị xét nghiệm} = \text{RFV bệnh nhân} / \text{RFV hiệu chuẩn}$$

Phiên giải các kết quả theo giá trị xét nghiệm như sau:

Giá trị xét nghiệm	Kết quả	Phiên giải/Khuyến nghị
< 1.00	Âm tính	Mẫu được xem là âm tính
≥ 1.00	Dương tính	Mẫu được xem là dương tính

- Các mẫu dương tính cần chạy lặp lại để khẳng định.
- Phiên giải các kết quả xét nghiệm nên được thực hiện xem xét bệnh sử của bệnh nhân, và kết quả của các xét nghiệm khác đã được thực hiện.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

229. *Clostridium difficile* PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của vi khuẩn *Clostridium difficile* trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của vi khuẩn *Clostridium difficile* được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, sự có mặt của vi khuẩn *Clostridium difficile* được xác định dựa vào kích thước của sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng so với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C

- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm phân, hoặc dịch nghi nhiễm *Clostridium difficile*
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng vi khuẩn *Clostridium difficile* chuẩn hoặc chủng *Clostridium difficile* đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách ADN bằng máy tự động hoặc bằng thủ công.

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	59 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μl sản phẩm PCR + 1.5 μl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút

- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

230. *Helicobacter pylori* Ag test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính nhanh kháng nguyên của *Helicobacter pylori* trong phân của người theo nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, Nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa:

- + Vạch C (Control line): Vạch chứng
- + Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh/Bác sĩ xét nghiệm/Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên bệnh nhân trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.

- Hút dung môi pha loãng lên tới vạch rồi nhỏ vào ống nghiệm. Thực hiện thao tác này 2 lần.
- Dùng tăm bông lấy khoảng 50 mg phân đưa vào ống nghiệm và xoay tăm bông khoảng 10 lần. Sau đó ép chặt tăm bông lên thành ống nghiệm rồi loại bỏ tăm bông.
- Đậy nắp nhỏ giọt vào ống nghiệm.
- Nhỏ 3 giọt dung dịch pha loãng vào giếng đã mẫu hình tròn, chữ “S”.
- Đọc kết quả trong khoảng 10 – 15 phút. Không được đọc kết quả sau 15 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu: C là vạch chứng (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

Hiện tượng	Kết quả
Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu ở vùng C và T	Dương tính
Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch ở vùng C	Âm tính
Trên thanh thử không xuất hiện vạch C	Không có giá trị
Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch ở vùng T	Không có giá trị

Lưu ý: Nếu vạch control không chuyển màu chứng tỏ test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Cặn phân che giếng S, khuấy mẫu đã nhỏ ở giếng (S) bằng que. Nếu xét nghiệm vẫn không thực hiện được, nhỏ thêm 1 giọt dung môi cho đến khi nhìn thấy dung dịch lỏng di chuyển đến vùng phản ứng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

231. *Helicobacter pylori* Ab test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính nhanh kháng thể IgG kháng *Helicobacter pylori* và kháng thể kháng yếu tố nhiễm trùng tái tổ hợp hiện có (CIM-current infection marker) trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể IgG và CIM kháng *Helicobacter pylori* (nếu có) kết hợp với kháng kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng nguyên tái tổ hợp đặc hiệu, tạo thành phức hợp miễn dịch làm đổi màu tại vạch thử test T tại vùng phản ứng.

Định nghĩa:

- + Vạch C (Control line): Vạch chứng
- + Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Helicobacter pylori* Rapid test
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương, máu toàn phần.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).

- Chuẩn bị test, đánh dấu tên bệnh nhân trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.

* Nếu bệnh phẩm là huyết thanh/huyết tương:

- Hút 25 µl bệnh phẩm nhỏ vào giếng hình vuông.
- Chờ tới khi bệnh phẩm di chuyển tới vạch màu hồng JUST PAST (vạch A) thì nhỏ 2 giọt CHASE BUFFER vào giếng hình tròn ở đầu thanh thử.
- Kéo miếng mika có chữ HP cho tới khi gặp sức cản không kéo được nữa thì nhỏ 1 giọt CHASE BUFFER vào giếng nhỏ bệnh phẩm hình vuông.
- Đọc kết quả trong vòng 15 phút. Không được đọc kết quả sau 15 phút.

* Nếu bệnh phẩm là máu toàn phần:

- Hút 25 µl bệnh phẩm nhỏ vào giếng nhỏ bệnh phẩm hình vuông, tiếp theo nhỏ 1 giọt CHASE BUFFER vào giếng này.
- Chờ tới khi bệnh phẩm di chuyển tới vạch màu hồng JUST PAST (vạch A) thì nhỏ 3 giọt CHASE BUFFER vào giếng hình tròn ở đầu thanh thử.
- Kéo miếng mika có chữ HP cho tới khi gặp sức cản không kéo được nữa thì dừng lại.
- Đọc kết quả trong vòng 15 phút. Không được đọc kết quả sau 15 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

Vạch chứng có màu hồng nhạt trước khi xét nghiệm phải có sự chuyển sang màu hồng đậm khi tiến hành phản ứng. Nếu như vạch này không thay đổi màu chứng tỏ thanh thử không có giá trị.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Kết quả thử nghiệm có thể như bảng sau:

Hiện tượng			Kết quả
Vạch A (chứng)	Vạch B (CIM)	Vạch C (IgG)	
+	+	+	Dương tính
+	-	+	Dương tính
+	-	-	Âm tính
-	±	±	Không có giá trị
+	+	-	Không có giá trị

- Biện luận kết quả:

- + Nếu chỉ có IgG dương tính: Bệnh nhân đã từng nhiễm *H.pylori*.
- + Nếu cả IgG và CIM dương tính: Bệnh nhân hiện đang bị nhiễm *H.pylori*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi: Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

232. *Helicobacter pylori* miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định định tính kháng thể IgM hoặc IgG hoặc IgA kháng *H.pylori* trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm *H. pylori* IgA/IgG/IgM ELISA
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Xử lý trước mẫu với chất hấp thụ yếu tố dạng thấp (RF) trước khi phát hiện IgM.
7	Cho chứng (1 giếng trống, 1 chứng âm, 2 giếng chuẩn) và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình.
8	Đậy tấm và ủ.
9	Rửa phiến nhựa.
10	Chuẩn bị chất cộng hợp
11	Đậy tấm và ủ
12	Rửa phiến nhựa
13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ phiến nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng
15	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
16	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 405 và 650nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Tính độ hấp phụ trung bình cho mỗi mẫu chứng âm và chứng dương.
- OD giếng trống phải < 0.25
- Chứng âm phải cho kết quả âm tính.

- Giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình của huyết thanh chuẩn phải trong khoảng tham chiếu hợp lệ ghi trong Giấy kiểm tra chất lượng bộ kit (Sau khi trừ đi độ hấp thụ của giếng trắng).
- Sự dao động giá trị OD của huyết thanh chuẩn không được cao hơn 20%.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Đánh giá xét nghiệm dựa trên giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng đặc hiệu số lô với đường chuẩn có trong các bộ thuốc thử để các giá trị OD thu được có thể phản ánh sự hoạt động của kháng thể tương ứng. Giá trị OD của giếng trống phải được trừ ra trước khi tính toán.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

233. *Helicobacter pylori* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của *Helicobacter pylori* từ mảnh sinh thiết dạ dày bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mảnh sinh thiết dạ dày, đờm, phân hoặc các dịch sinh học khác.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Lấy bệnh phẩm sinh thiết dạ dày: lấy qua ống nội soi đường miệng
- Quan sát thấy ổ loét, lấy 4 mẫu (3 mẫu ở các góc tổn thương loét, lấy ở vùng mép (ranh giới) của tổn thương và một mảnh ở trung tâm) hoặc lấy các vị trí có tổn thương nghi ngờ do *H. pylori* (trợt, niêm mạc sâu,...)
- Dùng kim lấy máu chuyển bệnh phẩm từ kim sinh thiết vào lọ đựng bệnh phẩm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng}$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.

- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:
- Cài đặt màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Chu kỳ nhiệt: Cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu JOE dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính, đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu JOE âm tính.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng với màu bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu từ sau chu kỳ 36 → đề nghị lấy mẫu lại để thực hiện xét nghiệm.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

- Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
- Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
- Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
- Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

234. *Leptospira* test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính nhanh kháng thể IgM kháng *Leptospira* trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể IgM kháng *Leptospira* (nếu có) kết hợp với kháng kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng nguyên tái tổ hợp đặc hiệu, tạo thành phức hợp miễn dịch làm đổi màu tại vạch thử test T tại vùng phản ứng.

Định nghĩa

+ Vạch C (Control line): Vạch chứng

+ Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh/Bác sĩ xét nghiệm/Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Leptospira* Rapid test
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Ly tâm ống bệnh phẩm 3000 vòng trong 10 phút

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu mã bệnh nhân trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Nhỏ huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm
- Nhỏ dung dịch pha loãng vào vùng nhỏ pha loãng theo hướng dẫn
- Đọc kết quả sau 15 – 20 phút

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

- Kết quả được chấp nhận khi xuất hiện màu rõ ràng, sắc nét ở vạch chứng C.

4.2.2 Đọc kết quả:

Kết quả thử nghiệm có thể như bảng sau:

- Dương tính khi xuất hiện màu ở vạch C và vạch T
- Âm tính khi xuất hiện màu ở vạch chứng C và không xuất hiện màu ở các vạch còn lại.
- Không có giá trị: vạch chứng C không xuất hiện sau phút thì cần kiểm tra lại hóa chất, các bước thực hiện, làm lại test khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Đọc kết quả trước 15-20 phút hoặc sau 30 phút có thể làm sai lệch kết quả.
- Cho quá ít bệnh phẩm, hay quá nhiều dung dịch pha loãng có thể làm ảnh hưởng đến nhận định kết quả.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

235. *Leptospira* PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của vi khuẩn *Leptospira* trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của vi khuẩn *Leptospira* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, sự có mặt của vi khuẩn *Leptospira* được xác định dựa vào kích thước của sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng so với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C

- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu toàn phần chống đông bằng EDTA, dịch cơ thể nghi nhiễm *Leptospira*
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng vi khuẩn *Leptospira* chuẩn hoặc chủng *Leptospira* đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách ADN bằng máy tự động hoặc bằng thủ công.

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	60 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μl sản phẩm PCR + 1.5 μl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel

- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì

khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả qua trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

236. *Mycoplasma pneumoniae* IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng *Mycoplasma pneumoniae* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng *Mycoplasma pneumoniae*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng *Mycoplasma pneumoniae* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Mycoplasma pneumoniae* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng *Mycoplasma pneumoniae* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng(pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) 10µl -200 µl tiệt trùng
- Đầu côn (tip) 1000 µl tiệt trùng
- Ống nghiệm nhựa 3-5ml không nắp
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Chai thuỷ tinh Duran

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ bác sĩ/kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA bán tự động bao gồm:
 - + Máy ủ (khoảng nhiệt độ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$),
 - + Máy rửa khay vi giếng 8 x 12 hàng
 - + Máy đọc, bước sóng 405nm – 630nm
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy vortex để trộn các hoá chất, và trộn đều mẫu khi pha loãng
- Bộ pipette tự động các kích cỡ từ 10 μl đến 1000 μl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.4 Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố $< 2.0 \text{ g/L}$, lipid/triglyceride $< 11.5 \text{ g/L}$, bilirubin $< 0.201 \text{ g/L}$
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất xuất và quy trình của phòng xét nghiệm

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số sinh phẩm cần thực hiện gắn vào giá đỡ
5	Pha loãng bệnh phẩm
6	Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng
7	Đậy và ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp
8	Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa
9	Nhỏ dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzyme) vào các giếng
10	Đậy và ủ giếng lần thứ hai
11	Rửa giếng
12	Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng
13	Ủ giếng lần thứ 3 (lưu ý tránh ánh sáng)
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng
16	Nhập kết quả đo được vào phần mềm tính toán theo hướng dẫn của nhà sản xuất

17	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị
----	---

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phân giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Tắc kim máy rửa, dẫn đến rửa bẩn. - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Máy ủ không đạt nhiệt độ yêu cầu. + Máy đo quang bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

237. *Mycoplasma pneumoniae* IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgM kháng *Mycoplasma pneumoniae* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgM kháng *Mycoplasma pneumoniae*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgM kháng *Mycoplasma pneumoniae* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Mycoplasma pneumoniae* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgM gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgM kháng *Mycoplasma pneumoniae* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng(pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) 10µl -200 µl tiệt trùng
- Đầu côn (tip)1000 µl tiệt trùng
- Ống nghiệm nhựa 3-5ml không nắp
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Chai thuỷ tinh Duran
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA bán tự động bao gồm:
 - + Máy ủ (khoảng nhiệt độ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$),
 - + Máy rửa khay vi giếng 8 x 12 hàng
 - + Máy đọc, bước sóng 405nm – 630nm
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy vortex để trộn các hoá chất, và trộn đều mẫu khi pha loãng
- Bộ pipette tự động các kích cỡ từ 10 μl đến 1000 μl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.4 Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố $< 2.0 \text{ g/L}$, lipid/triglyceride $< 11.5 \text{ g/L}$, bilirubin $< 0.201 \text{ g/L}$
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất xuất và quy trình của phòng xét nghiệm

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số sinh phẩm cần thực hiện gắn vào giá đỡ
5	Pha loãng bệnh phẩm
6	Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng
7	Đậy và ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp
8	Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa
9	Nhỏ dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzyme) vào các giếng
10	Đậy và ủ giếng lần thứ hai
11	Rửa giếng
12	Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng
13	Ủ giếng lần thứ 3 (lưu ý tránh ánh sáng)
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng
16	Nhập kết quả đo được vào phần mềm tính toán theo hướng dẫn của nhà sản xuất
17	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Tắc kim máy rửa, dẫn đến rửa bẩn. - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Máy ủ không đạt nhiệt độ yêu cầu. + Máy đo quang bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

238. *Mycoplasma pneumoniae* IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng *Mycoplasma pneumoniae* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng *Mycoplasma pneumoniae*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng *Mycoplasma pneumoniae* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Mycoplasma pneumoniae* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng *Mycoplasma pneumoniae* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng.
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tuyền thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Đề kháng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

239. *Mycoplasma pneumoniae* IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgM kháng *Mycoplasma pneumoniae* trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgM kháng *Mycoplasma pneumoniae*.
- Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgM kháng *Mycoplasma pneumoniae* sẽ kết hợp với các kháng nguyên *Mycoplasma pneumoniae* được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgM gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgM kháng *Mycoplasma pneumoniae* bao gồm: vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu, mẫu chứng, mẫu chuẩn, dung dịch pha loãng mẫu, dung dịch rửa đậm đặc, kháng thể gắn enzyme, cơ chất/ chất tạo màu, dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- Khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sĩ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoạch Âm tính
 - + Hoạch Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

240. *Mycoplasma pneumoniae* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của *Mycoplasma pneumoniae* trong bệnh phẩm đờm, tăm bông mũi họng, tăm bông mũi và dịch rửa phế quản phế nang (BAL) của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: đờm, tăm bông mũi họng, tăm bông mũi và dịch rửa phế quản phế nang (BAL)
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* Real-time PCR: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:
- Cài đặt màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Chu kỳ nhiệt: Cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính, đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng với màu FAM bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu từ sau chu kỳ 36 → đề nghị lấy mẫu lại để thực hiện xét nghiệm.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính với giá trị $Ct < 38$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

Nhiệm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

- Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
- Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
- Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
- Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

241. *Mycoplasma hominis* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của vi khuẩn *Mycoplasma hominis* trong mẫu bệnh phẩm âm đạo, niệu đạo, nước tiểu, dịch tiết của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, dựa trên phản ứng khuếch đại DNA đích, trong đó sự nhân bản của DNA được theo dõi theo thời gian thực thông qua tín hiệu huỳnh quang. Cường độ huỳnh quang tỉ lệ thuận với lượng sản phẩm khuếch đại, cho phép định lượng chính xác DNA ngay trong quá trình phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10μL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chống đông.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

a. Tách chiết acid nucleic

- Sử dụng chứng nội sinh cho các loại bệnh phẩm, trừ nước tiểu.
- Trong bộ kit có chứng nội ASTI
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Hút Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* Real-time PCR: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.

- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.
- Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2. Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả.
- Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh

huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

242. *Rickettsia* Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định định tính kháng thể IgM hoặc IgG kháng *Rickettsia* trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgM hoặc IgG kháng *Rickettsia* dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm Scrub Typhus IgM/IgG ELISA
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm

- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Cho 100 µl chứng (2 chứng âm, 2 chứng dương) và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình.
7	Đậy tấm và ủ ở 37°C trong 30 phút trong bể ủ nhiệt ướt.
8	Rửa phiến nhựa.
9	Chuẩn bị chất cộng hợp và nhỏ vào mỗi giếng 100 µl.
10	Đậy tấm và ủ ở 37°C trong 30 phút trong bể ủ nhiệt ướt.
11	Rửa phiến nhựa
12	Cho 150 µl dung dịch rửa vào các giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, không đậy tấm
13	Rửa phiến nhựa
14	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
15	Ủ phiến nhựa ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, không đậy tấm và tránh ánh sáng
16	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
17	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 405 và 650nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Tính độ hấp phụ trung bình cho mỗi mẫu chứng âm và chứng dương.
- Chứng âm < 0,2

- Chứng dương $> 0,5$.
- Khả năng phân biệt (RPC/NC) $\geq 5,0$
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Các mẫu có giá trị đo quang phổ $>$ Ngưỡng CO được coi là “Phản ứng”.
- Các mẫu có giá trị đo quang phổ $<$ Ngưỡng CO được coi là “Không phản ứng”.
- Bất kỳ mẫu “Phản ứng” nào cũng phải được lặp lại để xác minh kết quả. Các giá trị gần Ngưỡng cắt được coi là đáng ngờ và xét nghiệm phải được lặp lại ba lần hoặc nhiều hơn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

243. *Rickettsia* Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể kháng *Rickettsia* trong huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA. Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- *Rickettsia* Ab: Kháng thể kháng *Rickettsia*.
- ELISA: Enzym Linked Immunosorbent Assay – miễn dịch hấp phụ gắn enzym.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Rickettsia tsutsugamushi* IgG/ IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Ống Falcon 5-15ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất..

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Rickettsia tsutsugamushi* IgG, IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i>

Các bước	Nội dung
	Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Rickettsia Ab trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Rickettsia Ab bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. <i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Cho 100µl chứng âm, chứng dương, bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng tương ứng.(Giếng A1 là giếng trống) Ủ ở 37 °C trong 30 phút Rửa 6 lần: 300 µl dung dịch rửa/giếng/lần Cho 100µl Engyme conjugate/ giếng (trừ giếng trống) Ủ ở 37 °C trong 30 phút Rửa 6 lần: 300 µl dung dịch rửa/giếng/lần Cho 150 µl dung dịch rửa (Wash solution) vào các giếng (trừ giếng trống) Đề 5 phút ở nhiệt độ phòng (20 – 25 độ) Rửa 6 lần: 300 µl dung dịch rửa/giếng/lần Cho 100 µl dung dịch TMB (chất tạo màu) vào các giếng

Các bước	Nội dung
	Đề 10 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng Cho 50 µl dung dịch dừng phản ứng (Stop solution) vào mỗi giếng. Đề 1 phút Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450 nm
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cắt nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Kết quả xét nghiệm được xem là hợp lệ nếu các thông số sau đáp ứng các điều kiện:
 - Giá trị chứng âm (NC) < 0.2
 - Giá trị chứng dương (PC) > 0.5
 - Tỷ lệ PC/NC $>$ hoặc $= 5$
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, thử nghiệm là không hợp lệ và phải được thực hiện lại.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

* Tính giá trị ngưỡng:

- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (CO): Là tổng của giá trị trung bình chứng âm (OD) + 3 lần độ lệch chuẩn của chứng âm (SD)

* Diễn giải kết quả

Giá trị đo mẫu (OD)

- Nếu OD mẫu $<$ giá trị ngưỡng (CO): Âm tính.
- Nếu OD $>$ giá trị ngưỡng: Dương tính.

4.2.3. Quy định chạy lại xét nghiệm

- Tất cả các mẫu Dương tính đều phải chạy lại lần 2 để khẳng định
- Các mẫu có OD sát ngưỡng cũng phải chạy lại để khẳng định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

244. SARS-CoV-2 Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và định lượng kháng nguyên nucleocapsid protein của SARS-CoV-2 trong mẫu dịch tỵ hầu hoặc nước bọt của người trên máy miễn dịch tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm SARS-CoV-2 Ag là xét nghiệm miễn dịch kiểu sandwich 2 bước đặc hiệu, sử dụng công nghệ miễn dịch enzyme hóa phát quang (CLEIA) để phát hiện kháng nguyên nucleocapsid protein (N) của SARS-CoV-2 bằng cách sử dụng nhiều kháng thể kháng lại vùng nucleocapsid protein.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm SARS-CoV-2 Ag Cartridges set (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Chất chứng cho xét nghiệm SARS-CoV-2 Ag
- Chất hiệu chuẩn cho xét nghiệm SARS-CoV-2 Ag
- Cơ chất cho phản ứng miễn dịch enzyme hóa phát quang
- Đầu côn hút mẫu bệnh phẩm dùng cho máy miễn dịch tự động
- Dung dịch rửa hệ thống wash solution
- Dung dịch pha loãng
- Bộ dụng cụ xử lý mẫu
- Môi trường vận chuyển bệnh phẩm (Dùng với mẫu phẩm là dịch ngoáy tỵ hầu trong môi trường vận chuyển vi rút)
- Bộ dung dịch tách chiết Nucleocapsid protein (Dùng với mẫu phẩm là dịch ngoáy tỵ hầu xử lý bằng dịch tách chiết Nucleocapsid protein)
- Dung dịch pha loãng mẫu (Dùng với mẫu phẩm nước bọt)
- Que lấy dịch tỵ hầu
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng

- Lọc CO₂ dùng cho máy miễn dịch tự động
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 5-10 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch tỵ hầu và ngoáy mũi/họng ở người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	- Chuẩn bị thuốc thử: Thanh thử SARS-CoV-2 Ag bao gồm dung dịch hạt từ được phủ kháng thể, dung dịch kháng thể gắn enzyme và dung dịch xử lý bệnh phẩm. Bóc màng film khỏi thanh thử trước khi đưa vào máy, Cartridges chứa đầy dung dịch hạt phủ kháng thể và dung dịch kháng thể đánh dấu enzym. Bóc lớp màng trong suốt ra khỏi vỏ immunoreaction cartridge trước khi lắp vỏ để đo. - Chuẩn bị bộ chất chuẩn SARS-CoV-2 Ag: Để hóa chất ổn định ở nhiệt độ phòng. Hút 0,5 ml dung dịch hồi chỉnh vào mỗi lọ chuẩn đông khô rồi đảo trộn nhẹ nhàng. Dán barcode đi kèm vào ống đựng bệnh phẩm sample tube và hút 250 µl chất chuẩn vào ống sample tube. - Chuẩn bị dung dịch tách chiết bệnh phẩm cho tấm bông ty hầu: Để hóa chất ổn định ở nhiệt độ phòng. - Chuẩn bị dung dịch hiện màu: Cần đảm bảo nắp lọ được lắp đúng để tránh không khí vào hệ thống. - Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng 10 lần dung dịch rửa wash solution với nước cất và trộn đều, để dung dịch đã pha loãng ở nhiệt độ phòng - Chuẩn bị dung dịch pha loãng bệnh phẩm 1: dùng luôn

Các bước	Nội dung
2	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa. Nạp thêm thuốc thử để cho đủ số lượng chạy trong ngày
3	Kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn:. + Lần đầu tiên chạy thử nghiệm SARS-CoV-2 Ag + Khi thay đổi lô hóa chất + Khi chạy chứng SARS-CoV-2 Ag thấy kết quả vượt ra ngoài dải giới hạn cho phép. + Sau 30 ngày kể từ ngày hiệu chuẩn lần trước. Đường chuẩn phải chạy đúng
4	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên thì tiến hành chạy chứng SARS-CoV-2 Ag Control bao gồm 2 mức: SARS-CoV-2 Ag-NEG và SARS-CoV-2 Ag -POS. Đánh giá kết quả QC, nếu kết quả QC đạt, tiến hành chạy mẫu bệnh phẩm.
5	Chạy mẫu theo các bước sau:
5.1	Chuẩn bị bệnh phẩm
5.2	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl mẫu bệnh phẩm đã xử lý vào sample cup tương ứng
5.3	Nhập yêu cầu xét nghiệm SARS-CoV-2 Ag
5.4	Nhấn phím [Assay start], máy sẽ bắt đầu chạy
5.5	Nếu kết quả vượt ra ngoài dải đo (> 5000 pg/mL) thì pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng bệnh phẩm 1 và tiến hành xét nghiệm lại: + Pha loãng tự động theo tỷ lệ 1:10, 1:100 hoặc 1:200 hoặc 1:10, 1:100, 1:200 hoặc 1:1000 tùy theo máy sử dụng. + Có thể pha loãng tay với dung dịch pha loãng bệnh phẩm 1 cho tới tỷ lệ 1:1000

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chạy kiểm tra mẫu chứng level 1 và mẫu chứng level 2 mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn được nêu trong hướng dẫn sử dụng mẫu chứng đính kèm. Nếu giá trị mẫu chứng nằm ngoài khoảng giới hạn được

nêu thì kết quả chạy mẫu không có giá trị và mẫu cần phải được xét nghiệm lại. Có thể cần tiến hành hiệu chuẩn lại.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Nồng độ kháng nguyên SARS-CoV-2 được tính toán tự động dựa trên dữ liệu của đường cong chuẩn. Kết quả được tính toán và báo cáo bằng đơn vị pg/mL.
- Dải đo: 0,60 – 5000 pg/mL
- Máy có thể báo nồng độ có giá trị < 0.01 pg/mL là ngoài dải đo được xem là không có phản ứng.
- Mẫu với nồng độ có giá trị ≥ 5000 pg/mL cần phải pha loãng tự động hoặc bằng tay và thực hiện lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng không đúng cách các thiết bị, thuốc thử hoặc những vật tư tiêu hao khác thì có thể dẫn đến dữ liệu không đáng tin cậy hoặc gây nguy hiểm. Cần đọc kỹ và làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

245. *Salmonella* Widal

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và bán định lượng kháng thể kháng *Salmonella* trong huyết thanh người bằng kỹ thuật ngưng kết.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Thử nghiệm Widal Anti - *Salmonella* là thử nghiệm ngưng kết tế bào vi khuẩn được bất hoạt trong suspension là dung dịch chứa vi khuẩn gắn chất màu. Dung dịch màu này cho phép dễ dàng nhận biết hiện tượng ngưng kết của vi khuẩn với kháng thể đặc hiệu trong mẫu huyết thanh..

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Anti *Salmonella*
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Ống đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý

- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút đến 24 giờ tùy theo mẫu âm tính hay dương tính.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm Vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ly tâm ống bệnh phẩm 3000 vòng trong 10 phút

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Xét nghiệm định tính

- | | |
|---|---|
| 1 | Nhỏ 80 µl bệnh phẩm và 50 µl (1 giọt) mỗi chủng vào các vòng tròn trên tấm bìa. |
| 2 | Lắc nhẹ đều dung dịch chứa kháng nguyên và nhỏ 1 giọt (50 µl) vào bên cạnh mỗi mẫu trong vòng tròn. |
| 3 | Dùng que trộn và dàn đều dung dịch lên bề mặt vòng tròn, mỗi mẫu sử dụng 1 que riêng. |
| 4 | Lắc đều tấm bìa trên máy lắc 100 vòng trong 1 phút. |

Ngưng kết trong ống nghiệm (khi xét nghiệm định tính là dương tính)

- Chuẩn bị hàng tube cho mỗi mẫu bệnh phẩm**

Pha loãng	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320 0	1/640 0	1/1280 0	
Mẫu (μl)	100							
NaCl 9g/l (ml)	1.9	1	1	1	1	1	1	
	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	Loại bỏ 1 ml

Chuyển 1ml từ tube có nồng độ pha loãng cao hơn sang tube có nồng độ thấp hơn.
Giếng cuối loại bỏ đi 1ml.

- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--|-----------|------|-------|-------|-------|--------|--------------|--------|-------|----------|-----|--|--|--|--|--|--|--|----------------|-----|---|---|---|---|---|---|--|--|------|------|------|------|------|------|------|--------------|
| 1 | Chuẩn bị hàng tube cho mỗi mẫu bệnh phẩm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <table border="1"> <tr> <td>Pha loãng</td><td>1/20</td><td>1/40</td><td>1/80</td><td>1/160</td><td>1/320</td><td>1/640</td><td>1/1280</td><td>.....</td></tr> <tr> <td>Mẫu (μl)</td><td>100</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>NaCl 9g/l (ml)</td><td>1.9</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td></td></tr> <tr> <td></td><td>1 ml</td><td>1 ml</td><td>1 ml</td><td>1 ml</td><td>1 ml</td><td>1 ml</td><td>1 ml</td><td>Loại bỏ 1 ml</td></tr> </table> | Pha loãng | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | | Mẫu (μl) | 100 | | | | | | | | NaCl 9g/l (ml) | 1.9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | Loại bỏ 1 ml |
| Pha loãng | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mẫu (μl) | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NaCl 9g/l (ml) | 1.9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | Loại bỏ 1 ml | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <p>Chuyển 1ml từ tube có nồng độ pha loãng cao hơn sang tube có nồng độ thấp hơn.
Giếng cuối loại bỏ đi 1ml.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Lắc nhẹ đều dung dịch chứa kháng nguyên và nhỏ 1 giọt vào mỗi tube | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Trộn lắc đều và ủ tube thử ở 37 oC trong 24h. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Nhận định kết quả	
1	Chứng đạt yêu cầu.
2	Hạt ngưng kết: Dương tính.
3	Không có hạt ngưng kết: Âm tính.
4	Hiệu giá ngưng kết $< 1/40$ coi là âm tính. Từ $1/80$ đến $1/160$ là nghi ngờ, Kháng thể $\geq 1/160$: Có nhiễm trùng <i>Samonella</i> trong thời gian gần.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất:

- + Mỗi lô sản phẩm đều nên được kiểm tra hiệu lực sản phẩm với đối chứng âm và dương.
- + Chứng phải đạt yêu cầu. Chứng dương phải có hiện tượng ngưng kết, chứng âm không được có hiện tượng ngưng kết.
- + Kết quả dương tính khi pha loãng sẽ được tính ở nồng độ pha loãng cao nhất mà vẫn xảy ra hiện tượng ngưng kết kể cả yếu.
- + Không xảy ra hiện tượng Prozone effect ở nồng độ pha loãng
 - $\leq 1/64$ đối với TO.
 - $\leq 1/4096$ đối với TH.
 - $\leq 1/640$ đối với AO.
 - $\leq 1/2048$ đối với AH.
 - $\leq 1/160$ đối với BO.
 - $\leq 1/4096$ đối với BH.
 - $\leq 1/160$ đối với CO.
 - $\leq 1/4096$ đối với CH.

4.2.2 Đọc kết quả:

Diễn giải kết quả:

- Hiệu giá ngưng kết $< 1/40$ coi là âm tính.
- Từ $1/80$ đến $1/160$ là nghi ngờ.
- Kháng thể $\geq 1/160$: Có nhiễm trùng *Samonella* trong thời gian gần.

Lưu ý: Dương phải có hiện tượng ngưng kết. Âm tính không được có hiện tượng ngưng kết.

Kết quả được xác định bán định lượng:

Dương tính ở nồng độ pha loãng huyết thanh mà khi pha loãng ở nồng độ cuối cùng đó vẫn cho kết quả ngưng kết dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Mẫu máu bị tán huyết nhiều.
- Cho quá ít bệnh phẩm, hay quá nhiều dung dịch pha loãng có thể làm ảnh hưởng đến nhận định kết quả.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

246. *Streptococcus pyogenes* ASO

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch phát hiện kháng thể kháng Streptolysin O (ASO) của *Streptococcus* Group A (*Streptococcus pyogenes*) trong huyết thanh của người bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết kháng nguyên - kháng thể tạo hạt để định tính và/ hoặc bán định lượng kháng thể kháng Streptolysin O

Nếu trong huyết thanh của người bệnh có ASO sẽ kết hợp với kháng nguyên Streptolysin O được phủ sẵn trên các hạt latex tạo ra các hạt ngưng kết trên nền hỗn dịch trong. Nếu trong huyết thanh của người bệnh không có ASO, sẽ không có sự kết hợp với kháng nguyên Streptolysin O và không tạo ra các hạt ngưng kết, hỗn dịch mịn và đồng nhất.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ vi sinh/ Bác sỹ xét nghiệm/ Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất ngưng kết hạt latex ASO
- Sinh phẩm chẩn đoán kháng thể kháng Streptolysin O ngưng kết hạt bao gồm:
 - + Dung dịch có hạt latex phủ kháng nguyên Streptolysin O
 - + Chứng dương với nồng độ ASO > 200 IU/ml
 - + Chứng âm
- Nước muối 0,9% vô trùng
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Phiến nhựa chuyên dụng cho phản ứng ngưng kết hạt latex
- Đầu côn (tip) 10 µl – 100 µl
- Ống nghiệm nhựa lấy mẫu 3-5ml không nắp
- Que gỗ/ nhựa sạch để trộn hỗn dịch phản ứng
- khay đựng bệnh phẩm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo Bác sỹ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy lắc rung phiến nhựa tự động để tối ưu hóa phản ứng kháng nguyên -kháng thể
- Pipette 10 µl -100 µl với đầu côn phù hợp để thực hiện xét nghiệm
- Đồng hồ tính phút (đồng hồ bấm giây)
- Tủ lạnh/ tủ bảo quản sinh phẩm 2⁰C- 8⁰C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh. Thể tích mẫu tối thiểu 1 ml.
 - + Mẫu không bị nhiễm bẩn, vỡ hồng cầu, mỡ máu cao
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng
- 30 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước	Nội dung
1	Đưa sinh phẩm về nhiệt độ phòng, lắc nhẹ nhàng lọ chứa hạt latex gắn kháng nguyên
2	Ghi mã bệnh phẩm vào ô vị trí thực hiện phản ứng trên phiến nhựa
3	Sử dụng Pipette với đầu côn phù hợp, lấy chứng âm/ chứng dương/ huyết thanh người bệnh với thể tích theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất vào mỗi ô vị trí trên phiến nhựa
4	Sử dụng pipet nhỏ giọt đi kèm bộ sinh phẩm, lấy dung dịch chứa hạt latex đã gắn kháng nguyên với thể tích theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất nhỏ vào cạnh giọt mẫu chứng âm/ chứng dương/ huyết thanh người bệnh trên mỗi ô vị trí tương ứng
5	Sử dụng que gỗ/ nhựa sạch trộn đều dung dịch chứa hạt latex với chứng âm/ chứng dương/huyết thanh người bệnh với nhau, dàn phủ đều bề mặt vị trí thực hiện phản ứng
6	Lắc đều phiến nhựa bằng tay hoặc dùng máy lắc 80-100 vòng/ phút
7	Đọc kết quả trong khoảng thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi thực hiện phản ứng với mẫu chứng âm và chứng dương đều đạt yêu cầu:

- Chứng âm: vùng phản ứng không có hiện tượng ngưng kết hạt, hỗn dịch mịn, đồng nhất
- Chứng dương: vùng phản ứng có hiện tượng ngưng kết hạt và hỗn dịch trong

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- Không có hiện tượng ngưng kết (hỗn dịch mịn, đồng nhất): ASO Âm tính
- Có hiện tượng ngưng kết (kết thành đám lớn hoặc thành các hạt nhỏ lấm tấm trên nền hỗn dịch trong): ASO Dương tính và/ hoặc nồng độ kháng thể theo đơn vị IU/ml.

Nếu cần kết quả bán định lượng nồng độ ASO, thì thực hiện tiếp kỹ thuật như sau:

- Pha loãng huyết thanh người bệnh với NaCl 0,9%, theo cách thức:

Tỉ lệ pha loãng huyết thanh với NaCl 0,9%	ASO (IU/ml)
1 huyết thanh (HT) + 1 NaCl 0,9% (1:2)	400 IU/ml
1 HT + 2 NaCl 0,9% (1:3)	600 IU/ml
1 HT + 3 NaCl 0,9% (1:4)	800 IU/ml
1 HT + 4 NaCl 0,9% (1:5)	1000 IU/ml
...	...

- Thực hiện phản ứng ngưng kết với các bước tương tự như trên, lần lượt từ tỉ lệ pha loãng huyết thanh ở mức thấp đến mức cao. Oti lệ huyết thanh pha loãng lớn nhất có xảy ra hiện tượng ngưng kết thì đọc nồng độ ASO tương ứng ở đó.

Ví dụ: ngưng kết xảy ra ở tỉ lệpha loãng huyết thanh lớn nhất là 1:4 thì nồng độ ASO là 800 IU/ml.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	- Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: Thấp khớp, viêm cầu thận, viêm amidan do tác nhân khác. - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Giai đoạn mới nhiễm Streptococcus group A ở trẻ 6 tháng đến 2 tuổi. + Nồng độ ASO > 2000 IU/ml có thể ức chế sự ngưng kết - Độ nhạy của kết quả giảm nếu sinh phẩm hóa chất không được thực hiện ở nhiệt độ quy định	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng khả năng xảy ra dương tính giả và âm tính giả - Trên lâm sàng, người bệnh có triệu chứng rõ thì cần tỉ lệ pha loãng huyết thanh cao hơn để tránh âm tính giả - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khuyến cáo hóa chất được đưa về

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn.	nhiệt độ phòng xét nghiệm trước khi sử dụng. - Thực hiện lại xét nghiệm với hóa chất sinh phẩm còn hạn sử dụng và đảm bảo chất lượng.
- Đọc và nhận định kết quả phản ứng sau thời gian khuyến cáo, kết quả bán định lượng có thể không chính xác - Phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Đọc kết quả trong khoảng thời gian khuyến cáo của nhà sản xuất sinh phẩm - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

247. *Treponema pallidum* RPR định tính

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm RPR để phát hiện định tính hoặc bán định lượng kháng thể Reagin (kháng thể không đặc hiệu với syphilis - xoắn khuẩn giang mai) trong huyết thanh của bệnh nhân bằng kỹ thuật ngưng kết hạt.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý xét nghiệm ngưng kết hạt. Kháng nguyên là một huyền dịch chứa các vi hạt carbon được bao phủ với phức hợp lipid - ngưng kết khi có mặt kháng thể reagin trong huyết thanh. Reagins là các kháng thể cơ thể hiện diện trong huyết thanh những bệnh nhân nhiễm syphilis do các mô bị phá hủy như gan, tim. Hiện tượng ngưng kết có thể quan sát được bằng mắt dưới dạng những hạt ngưng kết màu đen.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm RPR (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 200 µl
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- Bơm kim tiêm vô trùng 10ml
- Bông tiêm vô trùng
- Panh
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Máy lắc
- Tấm bìa hoặc phiến kính phản ứng
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm RPR (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Nhỏ 50 μ l mẫu và một giọt đối chứng âm và dương vào các vòng tròn khác nhau trên tấm bìa card.
2	Tái hòa tan kháng nguyên nhẹ nhàng.
3	Thêm một giọt kháng nguyên (20 μ l) đã đồng nhất vào mỗi vòng tròn thử nghiệm bên cạnh mẫu bệnh phẩm và các chứng, nhẹ nhàng tránh tạo bọt khí.
4	Dùng pipette sử dụng một lần hoặc que khuấy lan rộng mẫu ra đến mép vòng tròn. Sử dụng một que khuấy cho một mẫu.
5	Quay tấm bìa card trên máy lắc 80 - 100 r.p.m trong vòng 8 phút. Đọc kết quả muộn hơn 8 phút có thể cho kết quả dương tính giả.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào sổ hoặc file mềm. Có thể in ra kết quả đã nhập vào phần mềm quản lý xét nghiệm.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm:

Xem xét kết quả QC: NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- Đọc kết quả và nhận định kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Khi lấy card bìa ra khỏi rotator lắc tấm bìa card bằng tay 2 lần trước khi đọc kết quả. Ghi nhận và báo cáo theo đặc tính bên dưới:

Quan sát ngưng kết	Đọc kết quả	Báo cáo
Khối vừa và lớn	Dương tính	Phản ứng
Khối nhỏ	Dương tính yếu	Phản ứng yếu
Không tạo khối hoặc có gợn rất nhỏ	Âm tính	Không phản ứng

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Khuyến cáo kiểm tra lại kết quả nghi ngờ bằng cách xét nghiệm mẫu thử hoặc lấy mẫu mới xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

248. *Treponema pallidum* RPR định lượng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính hoặc bán định lượng kháng thể Reagin huyết tương trong huyết thanh bệnh nhân (kháng thể không đặc hiệu với syphilis - xoắn khuẩn giang mai) trong huyết thanh của bệnh nhân bằng kỹ thuật ngưng kết hạt.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật ngưng kết hạt. Kháng nguyên là một huyền dịch chứa các vi hạt carbon được bao phủ với phức hợp lipid - ngưng kết khi có mặt kháng thể reagin trong huyết thanh. Reagins là các kháng thể cơ thể hiện diện trong huyết thanh những bệnh nhân nhiễm syphilis do các mô bị phá hủy như gan, tim. Hiện tượng ngưng kết có thể quan sát được bằng mắt dưới dạng những hạt ngưng kết màu đen.

Định nghĩa:

- RPR: Rapid Plasma Reagin
- RPR Carbon Antigen: hạt Carbon gắn kháng nguyên phức hợp lipid Reagin
- Positive control : Mẫu chứng dương (nồng độ pha loãng reagin $\geq 1/4$)
- Negative control : Mẫu chứng âm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm/ Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm RPR
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- NaCl 0.9%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu cân 200 μ l
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Máy lắc
- Tấm bìa hoặc phiến kính phản ứng
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm RPR (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Nhỏ 50 µl mẫu và một giọt đối chứng âm và dương vào các vòng tròn khác nhau trên tấm bìa card.
2	Tái hòa tan kháng nguyên nhẹ nhàng.
3	Thêm một giọt kháng nguyên (20 µl) đã đồng nhất vào mỗi vòng tròn thử nghiệm bên cạnh mẫu bệnh phẩm và các chứng, nhẹ nhàng tránh tạo bọt khí.
4	Dùng pipette sử dụng một lần hoặc que khuấy lan rộng mẫu ra đến mép vòng tròn. Sử dụng một que khuấy cho một mẫu.
5	Quay tấm bìa card trên máy lắc 80 - 100 r.p.m trong vòng 8 phút. Đọc kết quả muộn hơn 8 phút có thể cho kết quả dương tính giả.
Xét nghiệm bán định lượng tiến hành khi xét nghiệm định tính RPR dương tính	
6	Sử dụng một pipette bán tự động, thêm 50µl nước muối sinh lý 9g/L vào vòng tròn 2, 3, 4 và 5. Không để nước muối lan ra. Có thể sử dụng ống nghiệm nhỏ để pha loãng huyết thanh bậc 2.
7	Thêm 50 µl mẫu bệnh nhân vào vòng tròn 1 và 2.
8	Trộn nước muối và mẫu trong vòng tròn 2, hút hỗn hợp lên xuống một cách cẩn thận để tránh hình thành bong bóng.
9	Chuyển 50µl từ hình tròn 2 sang hình tròn 3.
10	Thực hiện pha loãng theo cách tương tự cho đến vòng tròn cuối cùng, bỏ 50µl cuối cùng.
11	Sử dụng ống hút hoặc que khuấy lan các dung dịch ra xung quanh vòng tròn card thử nghiệm bắt đầu từ vòng tròn số 5 đến vòng tròn 1.
12	Tiến hành như lần kiểm tra định tính nhỏ kháng nguyên vào các vòng tròn đã pha loãng mẫu từ bước 3 đến bước 5.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào sổ hoặc file mềm. Có thể in ra kết quả đã nhập vào phần mềm quản lý xét nghiệm.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Đánh giá kết quả theo hướng dẫn nhà sản xuất. Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Khi lấy tấm bìa ra khỏi rotator lắc tấm bìa bằng tay 2 lần trước khi đọc kết quả. Ghi nhận và báo cáo theo đặc tính bên dưới:

Quan sát ngưng kết	Đọc kết quả	Báo cáo
Khối vừa và lớn	Dương tính	Phản ứng
Khối nhỏ	Dương tính yếu	Phản ứng yếu
Không tạo khối hoặc có gợn rất nhỏ	Âm tính	Không phản ứng

- Phản ứng huyết thanh phải được hiệu giá. Để hiệu giá làm dung dịch pha loãng 2 lần trong 9 g/l nước muối như được miêu tả trong Quy trình định lượng trước đó.
- Hiệu giá huyết thanh được xác định bởi độ pha loãng cao nhất được thể hiện kết quả dương tính.
- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường
- Khuyến cáo kiểm tra lại kết quả nghi ngờ bằng cách xét nghiệm mẫu thử hoặc lấy mẫu mới xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

249. *Treponema pallidum* TPHA định tính

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể đặc hiệu anti - *Treponema pallidum* trong huyết thanh hoặc huyết tương người và được sử dụng như một xét nghiệm hỗ trợ trong chẩn đoán và theo dõi tình trạng nhiễm vi khuẩn giang mai *Treponema pallidum* bằng kỹ thuật ngưng kết hồng cầu đặc hiệu.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

TPHA là thử nghiệm ngưng kết hồng cầu đặc hiệu để phát hiện kháng thể *Treponema pallidum*. Hồng cầu gia cầm được phủ với các thành phần kháng nguyên *T. pallidum* gây bệnh. Những tế bào này sẽ ngưng kết với kháng thể đặc hiệu *T. pallidum* trong mẫu bệnh phẩm và hình thành các hạt ngưng kết đặc trưng trong tấm thử nghiệm.

Định nghĩa:

- TP: *Treponema pallidum*.
- TPHA (*Treponema pallidum* Hemagglutination): thử nghiệm ngưng kết hồng cầu gián tiếp.
- Positive control : Mẫu chứng dương, huyết thanh miễn dịch người pha loãng 1:20
- Negative control: Mẫu chứng âm.
- TPHA Control cell (CC): Hồng cầu không gắn kháng nguyên
- TPHA Test cell (TC): Hồng cầu có gắn kháng nguyên (Nichols)
- Diluent (DIL): Pha loãng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm TPHA
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu cân 200 µl
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Đồng hồ bấm giây
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Tấm vi giếng chữ đáy U
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Phiến tấm nhựa thực hiện xét nghiệm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm TPHA. (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Mỗi mẫu cần 3 vi giếng.
2	Thêm 190 µl dịch pha loãng vào giếng 1.
3	Thêm 10 µl mẫu vào giếng 1 và trộn đều
4	Chuyển 25 µl từ giếng 1 đến giếng 2 và 3.
5	Đảm bảo tất cả test và control cells đều được tái hòa tan.
6	Thêm 75 µl control cell vào giếng 2.
7	Thêm 75 µl test cell vào giếng 3.
8	Lắc tấm nhẹ nhàng để trộn đều.
9	Đậy tấm và ủ trong 45 – 60 phút.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào sổ hoặc file mềm. Có thể in ra kết quả đã nhập vào phần mềm quản lý xét nghiệm.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Đánh giá kết quả nội kiểm theo hướng dẫn nhà sản xuất. Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.
- Chứng âm: Không có bất kỳ hiện tượng ngưng kết nào ở cả 2 giếng nhỏ Control Cells và Test Cells
- Chứng dương: có hiện tượng ngưng kết ở giếng Test Cells và âm tính không ngưng kết ở giếng Control Cells.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Dương tính mạnh: 4+: Mạng ngưng kết bao phủ toàn bộ bề mặt giếng, có thể có viền như trứng ốp
- Dương tính mạnh: 3+: Mạng ngưng kết phủ gần như toàn bộ bề mặt giếng
- Dương tính mạnh: 2+: Mạng ngưng kết phủ xung quanh dạng vòng nhẵn đỏ bề mặt giếng
- Dương tính yếu: 1+: Ngưng kết nhỏ hơn xung quanh tạo thành dạng vòng nhẵn đỏ nhưng nhỏ hơn.
- Không xác định $\pm$: Không rõ như cúc áo rỗng ở giữa.
- Âm tính: Thu gọn như cúc áo hoặc có lỗ rất nhỏ ở trung tâm.
- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Bất cứ hiện tượng ngưng kết ở giếng Control Cells là có ngưng kết với yếu tố không đặc hiệu và không trả được kết quả.

Mẫu bệnh phẩm có kết quả không rõ ràng cần được làm lại. Nếu kết quả lặp lại tương tự không thay đổi có thể trả âm tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

250. *Treponema pallidum* TPHA định lượng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm để phát hiện gián tiếp định tính kháng thể đặc hiệu anti - *Treponema pallidum* trong huyết thanh hoặc huyết tương người và được sử dụng như một xét nghiệm hỗ trợ trong chẩn đoán và theo dõi tình trạng nhiễm vi khuẩn giang mai *Treponema pallidum*.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

TPHA là thử nghiệm ngưng kết hồng cầu đặc hiệu để phát hiện kháng thể *Treponema pallidum*. Hồng cầu gia cầm được phủ với các thành phần kháng nguyên *T. pallidum* gây bệnh. Những tế bào này sẽ ngưng kết với kháng thể đặc hiệu *T. pallidum* trong mẫu bệnh phẩm và hình thành các hạt ngưng kết đặc trưng trong tấm thử nghiệm

Định nghĩa:

- TP: *Treponema pallidum*.
- TPHA (*Treponema pallidum* Heamagglutination): thử nghiệm ngưng kết hồng cầu gián tiếp.
- Positive control + : Mẫu chứng dương, huyết thanh miễn dịch người pha loãng 1:20
- Negative control - : Mẫu chứng âm.
- TPHA Control cell (CC): Hồng cầu không gắn kháng nguyên
- TPHA Test cell (TC): Hồng cầu có gắn kháng nguyên (Nichols)
- Diluent (DIL): Pha loãng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm TPHA (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu cân 200 µl

- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Tấm ví giếng đáy chữ U
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Phiến tẩm nhựa thực hiện xét nghiệm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm TPHA. (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Mỗi mẫu cần 3 vi giếng.
2	Thêm 190µl dịch pha loãng vào giếng 1.
3	Thêm 10µl mẫu vào giếng 1 và trộn đều
4	Chuyển 25µl từ giếng 1 đến giếng 2 và 3.
5	Đảm bảo tất cả test và control cells đều được tái hòa tan.
6	Thêm 75µl control cell vào giếng 2.
7	Thêm 75µl test cell vào giếng 3.
8	Lắc tám nhẹ nhàng để trộn đều.
9	Đậy nắp và ủ trong 45 – 60 phút.
Xét nghiệm bán định lượng tiến hành khi xét nghiệm định tính TPHA dương tính	
10	Mỗi mẫu cần 9 vi giếng.
11	Thêm 190 µl dịch pha loãng vào giếng 1
12	Thêm 25 µl dịch pha loãng vào giếng 4 đến giếng cần định pha loãng theo nguyên tắc pha loãng bậc 2.
13	Tạo độ pha loãng 1/20 bằng cách thêm 10 µl huyết thanh vào giếng 1 và trộn đều.
14	Chuyển 25µl dung dịch có độ pha loãng 1/20 từ giếng 1 đến giếng 2, 3 và 4.
15	Trộn dung dịch có độ pha loãng 1/40 trong giếng 4 và chuyển 25 µl đến giếng 5.

16	Lặp lại bước này cho đến khi quá trình pha loãng được hoàn thành, loại bỏ 25 µl dịch pha loãng cuối cùng.
17	Đảm bảo tất cả test và control cells đều được tái hòa tan đều.
18	Thêm 75 µl test cell vào giếng 3 đến giếng cuối.
19	Thêm 75 µl control cell vào giếng 2.
20	Lắc tấm nhẹ nhàng để trộn đều.
21	Đậy tấm và ủ trong 45 – 60 phút.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào sổ hoặc file mềm. Có thể in ra kết quả đã nhập vào phần mềm quản lý xét nghiệm.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.
- Chứng âm: Không có bất kỳ hiện tượng ngưng kết nào ở cả 2 giếng nhỏ Control Cells và Test Cells
- Chứng dương: có hiện tượng ngưng kết ở giếng Test Cells và âm tính không ngưng kết ở giếng Control Cells.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Dương tính mạnh: 4+ Mạng ngưng kết bao phủ toàn bộ bề mặt giếng, có thể có viên như trứng ốp
- Dương tính mạnh: 3+: Mạng ngưng kết phủ gần như toàn bộ bề mặt giếng
- Dương tính mạnh: 2+: Mạng ngưng kết phủ xung quanh dạng vòng nhẫn đỏ bề mặt giếng
- Dương tính yếu: 1+: Ngưng kết nhỏ hơn xung quanh tạo thành dạng vòng nhẫn đỏ nhưng nhỏ hơn.
- Không xác định ±: Không rõ như cục áo rồng ở giữa.
- Âm tính: Thu gọn như cục áo hoặc có lỗ rất nhỏ ở trung tâm.

Kết quả được xác định bán định lượng:

Dương tính ở nồng độ pha loãng huyết thanh mà khi pha loãng ở nồng độ cuối cùng đó vẫn cho kết quả ngưng kết dương tính.

Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Bất cứ hiện tượng ngưng kết ở giếng Control Cells là có ngưng kết với yếu tố không đặc hiệu và không trả được kết quả.
- Mẫu bệnh phẩm có kết quả không rõ ràng cần được làm lại. Nếu kết quả lặp lại tương tự không thay đổi có thể trả âm tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

251. *Treponema pallidum* miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm để phát hiện định tính kháng thể *Treponema pallidum* (TP) trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang “ECLIA”. Dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KKT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

Định nghĩa:

- TP: *Treponema pallidum*.
- ECLIA (The electrochemiluminescence Immunoassay): thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang.
- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng.
- Sample Cups: Cốc đựng mẫu

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm Syphilis (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Cleancell M
- Procell M
- Preclean M
- ISE Cleaning Solution
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay

- Dung dịch khử trùng
- Vật tư tiêu hao, vật tư thay thế
- Assay Tip/Cup E170
- Sample Cup
- Nắp nhôm đậy ống nghiệm
- Đầu côn 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn 1000 μ L - tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 5-10 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 μ l đến 1000 μ l

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm Syphilis (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn: + Nếu tại vị trí có ô Syphilis hiển thị màu đỏ có nghĩa đó là lô thuốc thử mới cần phải hiệu chuẩn. + Sau 12 tuần nếu sử dụng các hộp thuốc thử cùng lô. + Sau 28 ngày nếu vẫn sử dụng cùng lọ thuốc thử được bảo quản ngay trên máy. + Khi chạy chứng PreControl Syphilis thấy kết quả vượt ra ngoài dải giới hạn cho phép.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên (nếu thấy cần thiết) thì tiến hành chạy mẫu theo các bước sau

Các bước	Nội dung
4	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút
5	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
6	Vào màn hình Workplace → Test Selection
7	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
8	Chọn tên test
9	Vào Barcode Read Error
10	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
11	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
12	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 13 – 15	
13	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Quản lý thông tin phòng xét nghiệm.
14	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
15	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.
- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Hệ thống sẽ tính toán giá trị ngưỡng phát hiện (CO) dựa trên kết quả đo Syphilis Cal 1, Syphilis Cal 2.
- Xét nghiệm Syphilis TP có thể biểu hiện dưới dạng có phản ứng hoặc không có phản ứng dưới dạng chỉ số ngưỡng (COI: tín hiệu mẫu (S)/tín hiệu ngưỡng (CO))

- Mẫu có giá trị $S/CO < 1,00$ được xem như không có phản ứng với xét nghiệm Syphilis. Các mẫu này được xem là âm tính đối với kháng thể đặc hiệu kháng giang mai và không cần xét nghiệm thêm.
- Mẫu có giá trị $S/CO \geq 1,00$ được xem như có phản ứng với xét nghiệm Syphilis và cần làm thêm xét nghiệm khác, ví dụ ngưng kết hạt TPHA.
- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Mẫu có giá trị $S/CO \geq 1,00$ được xem như có phản ứng với xét nghiệm Syphilis cần thực hiện lại xét nghiệm và làm thêm xét nghiệm khác để khẳng định, ví dụ ngưng kết hạt TPHA.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

252. *Treponema pallidum* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của vi khuẩn *Treponema pallidum* trong mẫu bệnh phẩm dịch vết loét sinh dục, dịch chọc hạch... của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Realtime PCR, dựa trên phản ứng khuếch đại DNA đích, trong đó sự nhân bản của DNA được theo dõi theo thời gian thực thông qua tín hiệu huỳnh quang. Cường độ huỳnh quang tỉ lệ thuận với lượng sản phẩm khuếch đại, cho phép định lượng chính xác DNA ngay trong quá trình phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10μL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm dịch vết loét sinh dục, dịch chọc hạch,...

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

a. Tách chiết acid nucleic

- Sử dụng chứng nội sinh cho các loại bệnh phẩm, trừ nước tiểu.
- Trong bộ kit có chứng nội ASTI
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Hút Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* Real-time PCR: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.

- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.
- Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2. Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR ☐ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng ☐ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ☐ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

253. *Ureplasma urelyticum* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của vi khuẩn *Ureplasma urelyticum* trong mẫu bệnh phẩm âm đạo, niệu đạo, nước tiểu, dịch tiết của người bằng kỹ thuật Real- time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, dựa trên phản ứng khuếch đại DNA đích, trong đó sự nhân bản của DNA được theo dõi theo thời gian thực thông qua tín hiệu huỳnh quang. Cường độ huỳnh quang tỉ lệ thuận với lượng sản phẩm khuếch đại, cho phép định lượng chính xác DNA ngay trong quá trình phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất, sinh phẩm tách chiết acid nucleic theo thiết bị sử dụng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm sử dụng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20μL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10μL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1µl đến 1000µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chống đông.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 tiếng).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

a. Tách chiết acid nucleic

- Sử dụng chứng nội sinh cho các loại bệnh phẩm, trừ nước tiểu.
- Trong bộ kit có chứng nội ASTI
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Hút Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR:* Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.

- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.
- Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2. Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\square$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\square$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\square$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

254. CMV đo tải lượng Real-time PCR

QTKTVS.28.260

1. ĐẠI CƯƠNG**1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Phát hiện DNA đặc trưng và đo tải lượng Cytomegalovirus trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ**2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Cytomegalovirus (CMV) PCR kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương, máu toàn phần, nước tiểu, mô sinh thiết (kích thước tối thiểu 1 x 1 x 1 mm).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (μl)	25	50	100	200
Thể tích IS (μl)	2,5	5	10	20

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau: $Số\ lượng\ ống\ (N) = Số\ bệnh\ phẩm + số\ chứng + 2$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia 30 μl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

Cho vào mỗi ống PCR 10 μl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 μl chứng dương và 10 μl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 40 μl.

Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.

Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:

Màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện *B.pertussis*, đồng thời cả hai màu FAM & Cy5 cho phát hiện *B.parapertussis*, màu HEX cho chứng nội.

Chu kỳ nhiệt:

- + 1 chu kỳ: 37°C/2 phút
- + 1 chu kỳ: 95 °C/10 phút
- + 45 chu kỳ: 95°C/5 giây
60 °C/40 giây – đọc sản phẩm
72°C/20 giây

Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành. Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu

TT	Màu FAM	Màu HEX	KẾT QUẢ
1	+	±	Dương tính với CMV
2	-	+	Không phát hiện CMV
3	-	+ (Ct>38)	Không có giá trị
4	-	-	Không có giá trị

Với những mẫu dương tính, sử dụng công thức sau để tính nồng độ virus trong mẫu:

$$\text{Copies/ml} = (\text{SC} \times \text{EV})/\text{IV}$$

$$\text{IU/ml} = (\text{SC} \times \text{EV}) \times 1/\text{IV}$$

Trong đó: SC (Sample Concentration) = Nồng độ virus trong mẫu (IU/μl)

EV (Elution Volume) = Thể tích mẫu thu sau tách chiết (μl)

IV (Isolation Volume) = Thể tích mẫu dùng để tách chiết (ml)

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

255. EBV đo tải lượng Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng và đo tải lượng EBV (Epstein – Barr Virus) trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm chẩn đoán EBV Realtime PCR
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động (nếu có)
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần hoặc máu cuống rốn được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA, Buffy coat, huyết tương, mô sinh thiết, nước tiểu, tăm bông, dịch não tủy...
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- *Huyết tương:* Máu toàn phần được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA. Huyết tương được tách ra bằng cách ly tâm 800-1.600 x g trong 20 phút. Huyết tương có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết tương có thể được bảo quản ở -18°C lên đến một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.
- *Mô sinh thiết:* đồng nhất mô theo cách cơ học sau đó hòa tan trong PBS vô trùng.
- *Nước tiểu:* sử dụng cạn
- *Mẫu tăm bông:* cho que tăm bông vào ống 1.5 ml và thêm 0.2 ml môi trường vận chuyển. Lắc que tăm bông mạnh trong ống môi trường khoảng 15-20 giây.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Chuyển 100 µl chứng âm (NC) sang tube dán nhãn C-. Chuyển 90 µl NC và 10 µl chứng dương và human DNA sang tube dán nhãn PCE. Chứng nội là DNA của bộ gen người.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

Các thành phần của Master mix được thực hiện như bảng sau:

Thành phần	Thể tích (μl)
PCR-mix-1	10 x N
PCR - buffer - FRT	5 x N
TaqF DNA Polymerase	0.5 x N

Vortex và ly tâm hỗn hợp Master mix trong vài giây, chia 15 μl Master mix vào ống PCR thích hợp với loại máy Realtime PCR đang sử dụng bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, mẫu chứng. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

Chú ý: Một lần chạy Real-time PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng chuẩn Calibrators KSG1 và KSG2.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

Cho vào mỗi ống PCR 10 μl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 μl Calibrators KSG1 và KSG2 vào ống chứng chuẩn và 10 μl RNA-buffer vào ống chứng âm. Thể tích cuối cùng là 25 μl.

Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.

Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:

Màu huỳnh quang: FAM/xanh cho phát hiện chứng nội, JOE/HEX/Cy3/vàng cho phát hiện EBV, màu ROX/Texas Red/cam cho phát hiện CMV, màu Cy5/đỏ cho phát hiện HHV6.

Chu kỳ nhiệt: Thiết lập chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.

Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Phân tích định tính

- Dương tính với EBV DNA: nếu giá trị Ct của kênh JOE / HEX / Cy3 / Yellow được phát hiện trong khoảng ranh giới và không vượt quá giá trị ngưỡng của kết quả dương tính
- Âm tính với EBV DNA: không có tín hiệu của kênh JOE / HEX / Cy3 / Yellow & giá trị Ct kênh FAM / Green không vượt quá giá trị Ct trong bảng giá trị Ct ranh giới

- Kết quả không hợp lệ nếu giá trị Ct của mẫu trên kênh JOE(Yellow)/HEX/Cy3 không xuất hiện trong khi giá trị Ct trên kênh FAM (Green) hoặc không có hoặc cao hơn giá trị giới hạn trong bảng giá trị Ct ranh giới → Cần lặp lại xét nghiệm với mẫu như vậy.

Phân tích đo tải lượng

Nếu DNA tổng số được chiết xuất từ máu toàn phần của con người, tế bào bạch cầu và sinh thiết, nồng độ theo log của các bản sao DNA trên mỗi số lượng tế bào tiêu chuẩn (10^5) trong các mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm được tính theo công thức sau:

$$\log \{ \frac{\text{EBV DNA copies in PCR sample}}{\text{Glob DNA copies in PCR sample}} \times 2 \cdot 10^5 \} = \log \{ \text{EBV DNA copies} / 10^5 \text{ of cells} \}.$$

Kết quả có thể được tính toán thủ công hoặc sử dụng bảng tính Excel theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.3. Nếu DNA tổng số được chiết xuất từ nước bọt, dịch hầu họng và dịch não tủy, thì nồng độ của DNA trên mỗi ml mẫu được tính theo công thức sau:

$$\text{Conc DNA} = \text{C DNA} \times 100 \text{ (bản sao / ml)}$$

* C DNA là số bản sao DNA EBV trong DNA mẫu

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: ⇒ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử ⇒ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

⇒ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

⇒ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

⇒ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

- Chứng dương bị hỏng ⇒ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

256. BK virus đo tải lượng Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định lượng DNA đặc trưng của BK virus trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml

- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần, huyết tương, dịch não tủy, nước tiểu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- *Máu toàn phần*: được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA. Không để đông lạnh máu toàn phần.
- *Huyết tương*: Máu toàn phần được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA. Huyết tương được tách ra bằng cách ly tâm 800-1.600 x g trong 20 phút. Huyết tương có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết tương có thể được bảo quản ở -18°C lên đến một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.
- *Nước tiểu*: thực hiện ly tâm (tối thiểu 1000 x g trong 20 phút) trước khi tách chiết DNA để đảm bảo sự lắng cặn của các tế bào có chứa virus..

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (µl)	25	50	100	200
Thể tích IS (µl)	2,5	5	10	20

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Hút 30 µl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* Realtime-PCR

Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Đánh số dây ống PCR 0,2 ml theo số thứ tự mẫu bệnh phẩm.
- Thêm 10 µl của mẫu axit nucleic của mẫu bệnh nhân hoặc Calibrator/ Control vào các ống PCR riêng lẻ. Thể tích cuối cùng của phản ứng sẽ là 40 µl.
- Đóng các ống, ly tâm nhanh (spindown), đặt vào máy Real-time PCR theo sơ đồ vị trí mẫu.
- Chọn chương trình luân nhiệt đã được cài đặt trên máy như sau:

AMPLIFICATION PROFILE

Step	Temperature	Time	Data Collection	Cycles
Hold	37 °C	2 min		1
Hold	95 °C	10 min		1
PCR	95 °C	5 s	FAM+HEX+Cy5	45
	60 °C	40 s		
	72 °C	20 s		

- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu Cy5, FAM, dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính hoặc âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu Cy5, FAM tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính hoặc âm tính.
- Chứng nội chuẩn (IS) được thêm vào mẫu bệnh phẩm trước khi tách chiết để kiểm soát quá trình tách DNA và chạy Real-time PCR. Những mẫu có chứng nội chuẩn không đạt cần phải được kiểm tra lại từ bước tách chiết.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Định tính

STT	Kênh màu huỳnh quang			Diễn giải KQ
	FAM	CY5	HEX	
1	+	-	+	BK virus: Dương tính
2	-	+	+	JC virus: Dương tính
3	+	+	+	BK & JC virus: Dương tính

4	-	-	+/- (Ct < 38)	Âm tính
5	-	-	+ (Ct > 38)	Không có giá trị
6	-	-	-	Không có giá trị

b. Định lượng

Áp dụng công thức sau để tính kết quả định lượng:

$$cp/ml = \frac{SC \times EV}{IV}$$

Trong đó:

- SC: Nồng độ mẫu đo được trong phản ứng (cp/μl)
- EV: Thể tích mẫu DNA thu được sau tách chiết (μl)
- IV: Thể tích mẫu bệnh phẩm dùng để tách chiết (ml)

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: ⇒ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử ⇒ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu (Ct > 36): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

ngoctlv.kcb - Truong Le Van Ngoc - 04/09/2023 - 16:23:00

257. JC Virus đo tải lượng Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng và đo tải lượng JC (John Cunningham) virus trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, trong đó nồng độ đoạn gen đích ban đầu có thể được xác định.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm BK/JC virus PCR kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động (nếu có)
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần, huyết tương, dịch não tủy, nước tiểu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- *Máu toàn phần:* được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA. Không để đông lạnh máu toàn phần.
- *Huyết tương:* Máu toàn phần được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA. Huyết tương được tách ra bằng cách ly tâm 800-1.600 x g trong 20 phút. Huyết tương có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết tương có thể được bảo quản ở -18°C lên đến một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.
- *Nước tiểu:* thực hiện ly tâm (tối thiểu 1000 x g trong 20 phút) trước khi tách chiết DNA để đảm bảo sự lắng cặn của các tế bào có chứa virus.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (μl)	25	50	100	200
Thể tích IS (μl)	2,5	5	10	20

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau: $Số\ lượng\ ống\ (N) = Số\ bệnh\ phẩm + số\ chứng + 2$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia 30 μl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

Cho vào mỗi ống PCR 10 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 µl Chứng chuẩn (standard) gồm 4 nồng độ (tối thiểu 3 nồng độ) để làm căn cứ tính nồng độ CMV trong mẫu và đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng và 10 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 40 µl.

Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.

Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:

- *Màu huỳnh quang*: FAM cho phát hiện BK virus, Cy5 cho phát hiện JC virus, màu HEX cho chứng nội.
- *Chu kỳ nhiệt*:

+ 1 chu kỳ: 37°C/2 phút

+ 1 chu kỳ: 95°C/10 phút

+ 45 chu kỳ: 95°C/5 giây

60°C/40 giây – đọc sản phẩm

72°C/20 giây

Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành. Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Xem xét kết quả nội kiểm (QC). Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu:

TT	Màu FAM	Màu Cy5	Màu HEX	KẾT QUẢ
1	+	-	±	Dương tính với BKV
2	-	+	±	Dương tính với JCV
3	+	+	±	Dương tính với BKV & JCV
4	-	-	+ (Ct<38)	Âm tính
5	-	-	- hoặc + (Ct>38)	Không có giá trị

Với những mẫu dương tính, sử dụng công thức sau để tính nồng độ virus trong mẫu:

$$\text{Copies/ml} = (\text{SC} \times \text{EV})/\text{IV}$$

Trong đó: SC (Sample Concentration) = Nồng độ virus trong mẫu (cp/µl)

EV (Elution Volume) = Thể tích mẫu thu sau tách chiết (µl)

IV (Isolation Volume) = Thể tích mẫu dùng để tách chiết (ml)

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

258. SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính RNA đặc trưng của SARS-CoV-2 trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm nCoV Real-Time Detection kit (VD hoặc tương đương)
- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiết trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm đường hô hấp: dịch ngoáy hầu họng và miệng hầu, và đờm (nếu có); dịch khí quản hoặc dịch rửa phế quản, phế nang với bệnh nhân có triệu chứng nặng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Thu nhận và xử lý mẫu: Lưu ý cần tiền xử lý bệnh phẩm với các mẫu nhày
- Tách chiết RNA: Tách chiết bằng tay hoặc tự động. Thêm vào mỗi mẫu 5 µl nội kiểm A khi tách chiết.
- Chạy One-step real-time RT-PCR:
 - Bật thiết bị chính và máy tính.
 - Khởi động phần mềm real-time PCR
 - Chuẩn bị MasterMix:
 - + Rã đông bộ kit thử. Trộn nhẹ nhàng và ly tâm nhanh bằng máy spindown.
 - + Thành phần mỗi loại tuân theo bảng hướng dẫn sau:

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$
 - + Chuẩn bị ống PCR premix theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hút 20 µl hỗn hợp vào mỗi ống phản ứng PCR (nếu trong bước tách đã cho nội kiểm A, còn nếu trong khi tách chưa cho nội kiểm A thì tổng thể tích là 20,5 µl đã bao gồm cả nội kiểm).

Thể tích (μl)/phần	1	3	4	5	6	7	8	9	10
Reaction Solution	14	42	56	70	84	98	112	126	140
Enzym RTase	6	18	24	30	36	42	48	54	60
Nội kiểm (IC) A (nếu trộn khi mix PCR)	0.5	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Tổng Thể tích MMX	20.5								

Lưu ý: - Hỗn hợp phản ứng PCR sau khi trộn đều vững ở 8°C trong 3 giờ.

- + Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng.
- + Chia 20 μl MasterMix vào mỗi ống phản ứng.
- + Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.
- + Thêm 5 μl sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống
- + Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.
- + Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.
- + Cài đặt chu trình nhiệt trên máy RT-PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- + Cài đặt sơ đồ mẫu
- + Bắt đầu chạy chương trình. Lưu file dữ liệu vào thư mục thích hợp.

Lưu ý: tên file bao gồm: ngày chạy mẫu, các mẫu bệnh phẩm trong mẻ chạy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Xem xét kết quả nội kiểm (QC). Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

259. SARS-CoV-2 Ag test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm phát hiện định tính các kháng nguyên SARS-CoV-2 có trong dịch tỵ hầu ở người bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa: SARS-CoV-2 Ag (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antigen): Kháng nguyên của SARS-CoV-2.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm SARS-CoV-2 Ag (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tăm bông vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch tỵ hầu và ngoáy mũi/họng ở người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám bệnh chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
2.1	Đề sinh phẩm cân bằng nhiệt độ phòng khoảng 30 phút. Đánh số, viết sơ đồ và sắp xếp bệnh phẩm theo thứ tự..
2.2	Kiểm tra hạn sử dụng đăng sau mỗi gói giấy bạc. Không sử dụng bộ xét nghiệm khi đã quá hạn sử dụng. Kiểm tra thanh thử và gói hút ẩm bên trong gói giấy bạc.
2.3	Lấy thanh thử ra khỏi túi đựng và đặt lên bề mặt khô, phẳng.
2.4	Dịch từ ty hầu: - Đưa tăm bông vô trùng từ mũi bệnh nhân vào đến khoang ty hầu, xoay tăm bông trên bề mặt khoang ty hầu rồi từ từ lấy tăm bông ra khỏi mũi. - Cho tăm bông vào tuýp chứa dung dịch đệm tách chiết, bóp nhẹ thành tuýp và xoay tăm bông ít nhất 5 lần. - Bóp nhẹ thành tuýp để thu hết dịch chiết trước khi lấy tăm bông ra. Dịch từ môi trường lưu trữ vận chuyển mẫu: Dùng micropipet, hút 350 µl bệnh phẩm trong tuýp lưu trữ vào tuýp đựng dung dịch đệm tách chiết. Hộn đều bệnh phẩm với dung dịch đệm tách chiết.
2.5	Lắp chặt nắp có vòi lên trên miệng tuýp
2.6	Nhỏ 3 giọt bệnh phẩm đã tách chiết vào giếng nhỏ mẫu trên thanh thử.
2.7	Đọc kết quả trong vòng 15 - 30 phút. Không đọc kết quả sau 30 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn $\Rightarrow$ Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng. Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

260. HBsAg test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên HBsAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh (huyết tương).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa

- Vạch C (Control line): Vạch chứng
- Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Xét nghiệm phát hiện HBsAg nhanh
1	Tách rời từng thanh xét nghiệm rồi bóc vỏ Ghi mã bệnh phẩm tương ứng
2	Nhỏ 50 µl huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm
3	Chờ 15 phút đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Dương tính: Xuất hiện 2 vạch đỏ ở phần chứng và phần bệnh phẩm.
- Âm tính: Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần chứng.
- Không xác định:
 - + Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần bệnh phẩm.
 - + Không có vạch đỏ nào xuất hiện ở phần chứng và phần bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Cặn phân che giếng S, khuấy mẫu đã nhỏ ở giếng (S) bằng que. Nếu xét nghiệm vẫn không thực hiện được, nhỏ thêm 1 giọt dung môi cho đến khi nhìn thấy dung dịch lỏng di chuyển đến vùng phản ứng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

261. HBsAb test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể kháng virus viêm gan B trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với chất cộng hợp có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý

- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Để tất cả các thành phần của Kit thử và mẫu về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm.
- Lấy dụng cụ xét nghiệm ra khỏi túi đựng và đặt lên mặt khô, phẳng.
- Nhỏ 100µl huyết thanh hoặc huyết tương vào giếng mẫu thử.
- Ngay sau khi nhỏ mẫu thử, sẽ thấy màu tía di chuyển đến cửa sổ đọc kết quả nằm ở giữa dụng cụ xét nghiệm.
- Đọc kết quả trong vòng 20 phút

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

262. HBcAb test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện HBcAb trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương của người.

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với chất cộng hợp có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

1.4. Định nghĩa

HBcAb: Kháng thể kháng kháng nguyên lõi của virus viêm gan B.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Lấy kit thử ra khỏi túi kín đựng sản phẩm và sử dụng kit thử càng nhanh càng tốt. Để đạt kết quả tốt nhất, toàn bộ quá trình xét nghiệm phải được hoàn thành trong vòng 1 giờ kể từ khi mở túi đựng sản phẩm.

- Đặt kit thử trên mặt phẳng sạch nằm ngang. Giữ ống nhỏ giọt theo phương thẳng đứng và nhỏ 3 giọt mẫu huyết thanh hoặc huyết tương (khoảng 75 μ l) vào “Vùng nhỏ mẫu” (S) của kit thử và bắt đầu tính thời gian.
- Chờ cho đến khi các vạch đỏ xuất hiện trên kit thử. Đọc kết quả trong vòng 15 phút. Không sử dụng kết quả quá 20 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu tím đỏ: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch.
- Ghi kết quả như bảng sau:

Hiện tượng	Kết quả
Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu tím đỏ	Âm tính
Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (kiểm tra C)	Dương tính
Trên thanh thử không xuất hiện vạch C	Test hỏng

Lưu ý: Độ đậm nhạt trên **vạch kết quả (T)** có thể khác nhau. Nhưng bất cứ độ mờ nào có ở **vạch kết quả (T)** thì cũng được coi là **Âm tính**

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh Y học*, ban hành kèm theo quyết định số 6769/QĐ-BYT ngày 08 tháng 11 năm 2018.
4. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

263. HBsAg miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên HBsAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh (huyết tương).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý : Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HBsAg bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị số giếng cần dùng, sơ đồ nhỏ mẫu, chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2	Nhỏ dung dịch loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng (tùy từng loại sinh phẩm).
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Chuẩn bị dung dịch rửa. Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng ($18^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
 - + NC: Độ hấp phụ của chứng âm.
 - + PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
 - + C.O: Giá trị ngưỡng thường được tính toán dựa trên giá trị trung bình của chứng âm. Công thức tính tùy thuộc từng nhà sản xuất sinh phẩm. VD $CO = NC_x + 0,05$
 - + NC_x : Giá trị trung bình của chứng âm.
 - + VD: $NC \leq 0,08$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + $PC \geq 1,000$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + VD cách tính: nếu có 4 giếng NC: $NC_x = NC_{OD} / 4$ (theo hướng dẫn của nhà sản xuất)
 - + VD: Loại chứng âm $NC > 0,08$ hoặc $NC > 40\% NC_x$. Chỉ được loại 1 chứng âm và tiếp tục tính kết quả theo 3 chứng âm còn lại (theo yêu cầu của từng nhà sản xuất sinh phẩm cụ thể).
- Đọc kết quả và biện luận

- + Sự có mặt hay không có mặt của kháng nguyên HBsAg được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang (OD) của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng (C.O), tính tỷ lệ OD/C.O.
- + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ < 1 được coi là âm tính.
- + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ ≥ 1 được làm lại. Nếu lần xét nghiệm thứ 2 giá trị tỷ lệ ≥ 1 . Mẫu huyết thanh coi là dương tính.
- + Mẫu huyết thanh có $0,9 < \text{tỷ lệ} < 1$. xét nghiệm lại 2 lần:
- + Giá trị tỷ lệ xét nghiệm lặp lại ≥ 1 : mẫu được coi là dương tính.
- + Giá trị tỷ lệ xét nghiệm lặp lại có $0,9 < \text{tỷ lệ} < 1$: nên xét nghiệm lại cho bệnh nhân bằng phương pháp khác hoặc yêu cầu lấy lại bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

264. HBsAb miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể HBsAb kháng kháng nguyên bề mặt HBsAg của virus viêm gan B trong huyết thanh (huyết tương) người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HBsAb bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị xô giếng cần dùng, sơ đồ nhỏ mẫu
2	Nhỏ dung dịch loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng.
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Chuẩn bị dung dịch rửa. Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng ($18^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dùng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
 - + Giá trị trung bình của Calibrator 10 mIU/ml (C1) là giá trị ngưỡng của phản ứng (Cut-off-C.O).
 - + Độ hấp phụ của chứng âm phải đạt giá trị trong khoảng cho phép của nhà sản xuất.
 - + Độ hấp phụ của chứng dương C2 phải đạt giá trị trong khoảng cho phép của nhà sản xuất
 - + Nếu một trong các giá trị của chứng âm hoặc chứng dương ở ngoài khoảng cho phép thì phản ứng không có giá trị và phải làm lại.
 - + Độ hấp phụ của Calibrator 10 mIU/ml đạt trong khoảng cho phép của nhà sản xuất.
 - + Nếu một trong hai giá trị của Calibrator 10 mIU/ml (C1) OD_{C1} ở ngoài khoảng cho phép thì phản ứng không có giá trị và phải làm lại.
 - + Đọc kết quả và biện luận
 - + Sự có mặt hay không có mặt của anti-HBs được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang (OD) của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng.
 - + Kết quả âm tính: Mẫu thử có $\text{OD} < \text{C.O}$ được coi như âm tính với HBsAb.
 - + Kết quả dương tính: Mẫu thử có $\text{OD} \geq \text{C.O}$ được coi như dương tính với HBsAb.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

265. HBsAg miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên HBsAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh (huyết tương) bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA (miễn dịch hóa phát quang, điện hóa phát quang hoặc miễn dịch huỳnh quang liên kết enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HBsAg bằng kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng PXN.

Bộ sinh phẩm HBsAg (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HBsAg
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng, chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là HBsAg
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

Nhận định kết quả xét nghiệm HBsAg

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- + Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- + Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.
- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - + Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm.
- Kết quả và báo cáo
 - + Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên giá trị hiệu chuẩn của lô thuốc thử. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là có phản ứng hoặc không có phản ứng cùng với chỉ số ngưỡng (COI) của mẫu.

Kết quả được diễn giải như sau:

- Nếu $COI < 0.90$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với HBsAg.
- Nếu $0.90 \leq COI \leq 1.0$: mẫu bệnh phẩm này cần phải kiểm tra lại
- Nếu $COI > 1.0$: mẫu được khẳng định là Dương tính với HBsAg sau khi đã được khẳng định theo quy trình biện luận của từng PXN (VD: cắt ngưỡng COI và thực hiện lại xét nghiệm sử dụng cùng phương pháp hoặc phương pháp khác, thực hiện thêm xét nghiệm HBsAg khẳng định...)

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)

Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm

- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất
- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

266. HBsAg kháng định

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Kháng định sự hiện diện của kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) trong mẫu huyết thanh và huyết tương đã có phản ứng dương tính lặp lại khi xét nghiệm bằng các kỹ thuật miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Kháng định sự hiện diện của kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) dựa theo nguyên lý trung hòa kháng thể đặc hiệu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm HBsAg kháng định bằng kỹ thuật miễn dịch: CLIA, ECLIA...
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng PXN

Các bước	Xét nghiệm HBsAg khẳng định
	Thực hiện mẫu bằng bộ sinh phẩm pha loãng mẫu và tiền xử lý mẫu thủ công
1	Tiền xử lý mẫu: - Mẫu dương tính có chỉ số ngưỡng < 7.0: 270 µL mẫu + 30 µL thuốc thử khẳng định 270 µL mẫu + 30 µL thuốc thử chứng hoặc - Mẫu dương tính có chỉ số ngưỡng trong khoảng 7.0 và < 30: 150 µL mẫu + 150 µL thuốc thử khẳng định 150 µL mẫu + 150 µL thuốc thử chứng hoặc - Mẫu dương tính có chỉ số ngưỡng ≥ 30 Tiền pha loãng mẫu theo tỷ lệ 1:20 với Diluent Universal 150 µL mẫu pha loãng + 150 µL thuốc thử khẳng định 150 µL mẫu pha loãng + 150 µL thuốc thử chứng PreciControl HBsAg II 2, mẫu chứng dương, nên chạy song hành như kiểm tra hiệu năng xét nghiệm: 270 µL PreciControl HBsAg II 2 + 30 µL thuốc thử khẳng định 270 µL PreciControl HBsAg II 2 + 30 µL thuốc thử chứng Ủ hỗn hợp phản ứng: 30-60 phút ở 15-25 °C hoặc qua đêm ở 2-8 °C.
2	Thực hiện xét nghiệm định tính HBsAg trên mẫu PreciControl HBsAg II 2 và mẫu đã tiền xử lý
2.1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2.2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
2.3	Chạy chứng

2.4	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm và chứng. Hút 200 μ l mẫu và chứng, bao gồm vào sample cup tương ứng bao gồm 01 cup tiền xử lý với thuốc thử chứng và 01 cup tiền xử lý với thuốc thử khẳng định.
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là HBsAg
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Thực hiện mẫu bằng bộ sinh phẩm pha loãng mẫu và tiền xử lý mẫu tự động	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Thực hiện chạy chứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn lệnh thực hiện xét nghiệm HBsAg auto confirm theo hướng dẫn của nhà sản xuất
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ Y tế.

Nhận định kết quả xét nghiệm HbsAg:

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
 - + Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.
 - + Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm: chứng nội kiểm, ngoại kiểm HBsAg định tính (nếu có).
- Kết quả và báo cáo
 - + Đánh giá hiệu lực xét nghiệm

Chỉ số ngưỡng của PreciControl HBsAg II 2 trong xét nghiệm với thuốc thử khẳng định phải < 50 % so với chỉ số ngưỡng trong xét nghiệm với thuốc thử chứng:

- COI cho xét nghiệm với thuốc thử chứng $\approx$ 100 %

- COI cho xét nghiệm với thuốc thử khẳng định $\approx x \%$

Nếu $x > 50 \%$, cần kiểm tra điều kiện thực hiện xét nghiệm. Nếu cần thiết, lặp lại xét nghiệm với thuốc thử mới.

Mẫu được đánh giá là có hiệu lực khi chỉ số ngưỡng của mẫu xử lý với thuốc thử chứng phải ≥ 0.9 .

Chỉ số ngưỡng > 0.9 cho biết tỷ lệ pha loãng quá cao. Các mẫu này phải được xét nghiệm lại với mẫu không pha loãng hoặc tỷ lệ pha loãng thấp hơn.

Đánh giá và biện luận kết quả

Để khẳng định mẫu có kết quả Dương tính, chỉ số ngưỡng của mẫu với thuốc thử khẳng định phải $< 50 \%$ so với chỉ số ngưỡng của mẫu với thuốc thử chứng, và chỉ số ngưỡng này phải ≥ 0.9 .

Đánh giá:

- COI cho xét nghiệm với thuốc thử chứng $= 100 \%$
- COI cho xét nghiệm với thuốc thử khẳng định $= x \%$

Biện luận:

- $x > 50 \%$ và COI cho thuốc thử chứng ≥ 0.9 = Âm tính
- $x > 50 \%$ và COI cho thuốc thử chứng < 0.9 = Không giá trị
- $x < 50 \%$ và COI cho thuốc thử chứng ≥ 0.9 = Dương tính
- $x < 50 \%$ và COI cho thuốc thử chứng < 0.9 = Không xác định

Sử dụng thuốc thử mới và đo lại các mẫu có kết quả không giá trị.

Trong trường hợp kết quả vẫn không giá trị, nên xét nghiệm mẫu theo dõi tiếp theo.

Nên đo lặp lại các kết quả không xác định. Trong trường hợp kết quả vẫn không xác định, nên xét nghiệm mẫu theo dõi tiếp theo.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất
- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

267. HBsAg định lượng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định nồng độ kháng nguyên HBsAg của virus viêm gan B trong huyết thanh (huyết tương).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý : Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA, ECLIA (miễn dịch hóa phát quang, điện hóa phát quang).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm định lượng HBsAg bằng kỹ thuật CLIA, ECLIA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng PXN

Độ pha loãng bệnh phẩm đã được cài đặt mặc định là 1:400

Các bước	Xét nghiệm định lượng HBsAg
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode:	
1.	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
2.	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3.	Nhập mã bệnh phẩm
4.	Chọn tên test là HBsAg-Quant
5.	Vào Barcode Read Error
6.	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7.	Đặt mẫu cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
8.	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode:	
1.	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2.	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3.	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

Nhận định kết quả xét nghiệm định lượng HBsAg

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2, chứng 3 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm: đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning theo quy trình quản lý chất lượng của PXN

- Kết quả và báo cáo

Kết quả nồng độ HBsAg của mẫu bệnh phẩm là một giá trị cụ thể, đơn vị đo IU/ml. Tùy theo chế độ chạy mẫu sẽ có các dải định lượng khác nhau

- Chạy mẫu ở chế độ pha loãng tự động 1/400: Dải định lượng là 20 - 52.000 IU/ml.

* Nếu giá trị đo được nằm trong dải định lượng này thì kết quả cuối cùng là kết quả đo được trên máy. VD: Nồng độ HBsAg 25000 IU/ml

* Nếu giá trị đo được < 20 IU/ml $\rightarrow$ chạy lại bệnh phẩm không pha loãng.

* Nếu giá trị đo được > 52.000 IU/ml $\rightarrow$ Pha loãng bệnh phẩm 1: 100 bằng thủ công và chạy lại xét nghiệm theo các bước chạy mẫu.

- Chạy mẫu ở chế độ không pha loãng : Dải định lượng là 0,05 - 130 IU/ml.

Ngưỡng phát hiện: 0,05 IU/ml

* Nếu giá trị đo được thấp hơn ngưỡng phát hiện thì máy báo $< 0,05$ IU/ml $\rightarrow$ Trả kết quả dưới ngưỡng phát hiện.

* Nếu giá trị đo được lớn hơn dải định lượng thì máy báo > 130 IU/ml $\rightarrow$ thực hiện xét nghiệm ở chế độ pha loãng bệnh phẩm tự động 1:400 $\rightarrow$ Trả kết quả nồng độ HBsAg đo được trên máy, đơn vị đo IU/ml. VD: 1500 IU/ml

- Chạy mẫu pha loãng thủ công 1: 100

Những mẫu bệnh phẩm ở nồng độ pha loãng 1:400 cho kết quả > 52.000 thì pha loãng bệnh phẩm 1: 100 với dung dịch Dil Hep được cung cấp sẵn trong bộ sinh phẩm (như vậy mẫu đã được pha loãng 40.000 lần) và chạy lại xét nghiệm theo các bước chạy mẫu ở phần II.2.

Kết quả cuối cùng (IU/ml) = giá trị đo được trên máy x 100

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất
- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

268. HBsAb miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Định lượng kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAb) trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ECLIA (miễn dịch điện hóa phát quang).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ECLIA (miễn dịch điện hóa phát quang). Dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KKT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

Định nghĩa:

- HBsAg: Hepatitis B surface Antigen -Kháng nguyên bề mặt virus Viêm gan B.
- HBsAb: Hepatitis B surface Antibody-Kháng thể kháng kháng nguyên HBsAg.
- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Anti-HBs (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chân đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Controls
- Calibrators
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 20 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C-8°C
- Tủ âm sâu (-20°C)/ (-70°C)
- Dàn máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Hệ thống lọc nước khử ion
- Bộ lưu điện
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm Anti-HBs (VD hoặc tương đương)

Các bước	Xét nghiệm định lượng Anti-HBs
1	Kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Kiểm tra tình trạng hiệu chuẩn của máy. Hiệu chuẩn máy khi có yêu cầu.
3	Chạy chứng Precicontrol A-HBs bao gồm 2 mức: PC A-HBs1 và PC A-HBs2. Đánh giá kết quả QC đạt, tiến hành chạy mẫu bệnh phẩm
4	Chạy mẫu theo các bước sau:
5	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 6-13	
6	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
7	Vào màn hình Workplace → Test Selection
8	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
9	Chọn tên test là Anti-HBs II
10	Vào Barcode Read Error
11	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
12	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
13	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Nếu chạy mẫu có barcode thì bỏ các bước từ 6-11 và tiến hành như sau:	

14	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm của PXN
	Tiếp tục quay lại bước 12 và 13, bước 12 đặt trực tiếp ống máu vào rack màu xám, quay đầu có barcode ra ngoài, không cần order.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Máy xét nghiệm tự động tính toán nồng độ HBsAb. Tham khảo hướng dẫn sử dụng thiết bị để biết thông tin chi tiết.

Kết quả nên được diễn giải như sau:

- Những mẫu có nồng độ < 10 IU/l: nồng độ Anti-HBs trong mẫu bệnh phẩm không có hiệu lực bảo vệ chống nhiễm (tái nhiễm) virus viêm gan B
- Những mẫu có nồng độ ≥ 10 IU/l: nồng độ Anti-HBs trong mẫu bệnh phẩm có hiệu lực bảo vệ chống nhiễm (tái nhiễm) virus viêm gan B

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Mẫu bệnh phẩm có chứa các chất gây nhiễu vượt quá nồng độ theo khuyến cáo của nhà sản xuất như: mẫu có nồng độ bilirubin, biotin, các dược phẩm.
- Sử dụng hóa chất quá hạn sử dụng.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng...

Thực hiện xét nghiệm lại trong các trường hợp có sai sót.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

269. HBsAb định lượng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Định lượng kháng thể HBsAb kháng kháng nguyên bề mặt HBsAg của virus viêm gan B trong huyết thanh (huyết tương) người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA (miễn dịch hóa phát quang, điện hóa phát quang hoặc miễn dịch huỳnh quang liên kết enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm định lượng HBsAb bằng kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng PXN

Các bước	Xét nghiệm định lượng HBsAb
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là anti-HBs II
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

Nhận định kết quả HBsAb định lượng

- Kiểm tra chất lượng:
- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2.

- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và trong mỗi lô hóa chất anti-HBs khác nhau có thể có sự thay đổi về giới hạn chứng.

- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm: đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning theo quy trình quản lý chất lượng của PXN

- Kết quả và báo cáo

Máy sẽ tự động tính toán nồng độ phân tích của mỗi mẫu bệnh phẩm theo đơn vị IU/l. Dải đo được giới hạn từ 2.00 – 1000 IU/l (được xác định bằng giới hạn thấp nhất và giới hạn cao nhất của đường cong chuẩn)

- Nhận định kết quả

- Những mẫu có nồng độ anti-HBs < 10 IU/l: mẫu bệnh phẩm được coi là mẫu bệnh phẩm không có hiệu lực bảo vệ chống nhiễm (tái nhiễm) virus viêm gan B
- Những mẫu có nồng độ anti-HBs $\geq$ 10 IU/l: mẫu bệnh phẩm được coi là mẫu bệnh phẩm có hiệu lực bảo vệ chống nhiễm (tái nhiễm) virus viêm gan B.
- Những mẫu có giá trị $\geq$ 1000 IU/l thì có thể pha loãng với dung dịch pha loãng bệnh phẩm (Elecys Diluent Universal) theo tỷ lệ 1:100. Kết quả định lượng anti-HBs sau khi đã pha loãng phải > 10 IU/l.
 - + Nếu pha loãng bằng tay thì tính kết quả bằng cách nhân kết quả hiển thị trên máy với độ pha loãng.
 - + Nếu pha loãng tự động bằng máy thì máy sẽ tự động tính toán kết quả bằng phần mềm đã có sẵn

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.

- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất
- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

270. HBc IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể Anti-HBc-IgM kháng kháng nguyên lõi (HBcAg) của virus viêm gan B trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý : Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HBc IgM bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính HBc IgM
1	Chuẩn bị số giếng cần dùng, sơ đồ nhỏ mẫu, chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2	Pha loãng bệnh phẩm trong dung dịch pha loãng bệnh phẩm theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhỏ dung dịch loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng (tùy từng loại sinh phẩm).
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng ($18^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
 - + NC: Độ hấp phụ của chứng âm.
 - + PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
 - + C.O: Giá trị ngưỡng thường được tính toán dựa trên giá trị trung bình của chứng âm. Công thức tính tùy thuộc từng nhà sản xuất sinh phẩm. VD $\text{CO} = \text{NC}_x + \text{PC}_x$
 - + C_x : Giá trị trung bình của chứng dương.
 - + NC_x : Giá trị trung bình của chứng âm.
 - VD: $\text{NC} \leq 0,1$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + VD $\text{PC} \geq 0.4$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + VD cách tính: nếu có 3 giếng NC: $\text{NC}_x = \text{NC OD} / 3$ (theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

- Đọc kết quả và biện luận
 - + Sự có mặt hay không có mặt của kháng thể anti-HBc IgM được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang (OD) của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng (C.O), tính tỷ lệ OD/C.O.
 - + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ OD/C.O < 1 được coi là âm tính với anti-HBc IgM.
 - + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ OD/C.O $\geq$ 1 được làm lại. Nếu lần xét nghiệm thứ 2 giá trị tỷ lệ OD/C.O $\geq$ 1. Mẫu huyết thanh coi là dương tính với anti-HBc IgM.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

271. HBc total miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể HBc total trong huyết thanh (huyết tương) bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HBc total bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay

- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính HBc total
1	Chuẩn bị số giếng cần dùng, sơ đồ nhỏ mẫu, chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2	Pha loãng bệnh phẩm trong dung dịch pha loãng bệnh phẩm theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhỏ dung dịch loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng (tùy từng loại sinh phẩm).
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
 - + NC: Độ hấp phụ của chứng âm.
 - + PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
 - + C.O: Giá trị ngưỡng thường được tính toán dựa trên giá trị trung bình của chứng âm. Công thức tính tùy thuộc từng nhà sản xuất sinh phẩm. VD $CO = PC_x / 5$
 - + PC_x : Giá trị trung bình của chứng dương.
 - + NC_x : Giá trị trung bình của chứng âm.
 - + VD: $NC \leq 0,1$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + VD $PC \geq 1.0$ và $PC \leq 2.4$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + VD cách tính: nếu có 4 giếng PC: $PC_x = PC \text{ OD} / 4$ (theo hướng dẫn của nhà sản xuất)
- Đọc kết quả và biện luận

- + Sự có mặt hay không có mặt của kháng thể anti-HBc total được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang (OD) của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng (C.O), tính tỷ lệ OD/C.O.
- + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ OD/C.O < 0.9 được coi là âm tính với anti-HBc total .
- + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ OD/C.O ≥ 1 được làm lại. Nếu lần xét nghiệm thứ 2 giá trị tỷ lệ OD/C.O ≥ 1 . Mẫu huyết thanh coi là dương tính với anti-HBc total
- + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ OD/C.O trong khoảng 0.9 đến < 1.0 nên được nhận định một cách thận trọng (nên thực hiện xét nghiệm lại các mẫu liên quan bằng xét nghiệm lặp lại 2 lần khi hệ thống sử dụng và quy trình thí nghiệm cho phép điều đó).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

272. HBc IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể Anti-HBc IgM kháng kháng nguyên lõi (HBcAg) của virus viêm gan B trong huyết thanh, huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA (miễn dịch hóa phát quang, điện hóa phát quang hoặc miễn dịch huỳnh quang liên kết enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HBc IgM bằng kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng loại sinh phẩm sử dụng của PXN

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-HBc IgM
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng, chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là Anti-HBc IgM
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

Nhận định kết quả xét nghiệm Anti-HBc IgM

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
 - + Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - + Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm
- Kết quả và báo cáo
 - + Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên giá trị hiệu chuẩn của lô thuốc thử. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là có phản ứng hoặc không có phản ứng cùng với chỉ số ngưỡng (COI) của mẫu.

Kết quả được diễn giải như sau:

- Những mẫu xét nghiệm có $COI < 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với Anti-HBc IgM .
- Những mẫu xét nghiệm có $COI \geq 1.0$ mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với Anti-HBc IgM.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất

Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

273. HBc total miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể tổng số Anti-HBc total kháng kháng nguyên lõi (HbcAg) của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh (huyết tương) bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA (miễn dịch hóa phát quang, điện hóa phát quang hoặc miễn dịch huỳnh quang liên kết enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HBc total bằng kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)

- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng loại sinh phẩm sử dụng của PXN.

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-HBc total
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng, chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là Anti-HBc II
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

Nhận định kết quả xét nghiệm Anti-HBc total

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
 - + Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và trong mỗi lô hóa chất Anti-HBc total khác nhau có thể có sự thay đổi về giới hạn chứng
- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - + Chứng nội kiểm, ngoại kiểm(nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm
- Kết quả và báo cáo
 - + Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên giá trị hiệu chuẩn của lô thuốc thử. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là có phản ứng hoặc không có phản ứng cùng với chỉ số ngưỡng (COI) của mẫu.

Kết quả được diễn giải như sau:

- + Nếu mẫu xét nghiệm có $COI > 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với Anti-HBc.
- + Nếu mẫu xét nghiệm có $COI \leq 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với Anti-HBc.

Tất cả những mẫu dương tính cần phải kiểm tra lại 2 lần trên cùng bộ sinh phẩm:

- ✓ Nếu cả hai kết quả lặp lại > 1 : Kết luận âm tính
- ✓ Nếu một trong hai lần lặp lại có kết quả ≤ 1.0 : Kết luận dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất
- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

274. HBcrAg miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định lượng kháng nguyên liên quan đến lõi vi rút viêm gan B (HBcrAg) trong huyết tương hoặc huyết thanh người. Sản phẩm này được chỉ định như là một sản phẩm hỗ trợ cho chẩn đoán nhiễm vi rút viêm gan B và giám sát hiệu quả điều trị bằng kỹ thuật CLEIA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật CLEIA. Dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

Định nghĩa:

- CLEIA: chemiluminescence enzyme immunoassay-miễn dịch enzyme hóa phát quang
- HBcrAg (Hepatitis B core-related Antigen): Kháng nguyên liên quan đến lõi của virus viêm gan B.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm
- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Controls
- Calibrators
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Cốc đựng mẫu
- Nước tinh khiết
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C)
- Dàn máy miễn dịch tự động
- Máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Bộ lưuw điện
- Máy ly tâm thường
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị thuốc thử: Sử dụng cùng số lô của HBcrAg Pretreatment Solution và HBcrAg Calibrators với HBcrAg Immunoreaction Cartridges. HBcrAg Cartridges chứa đầy dung dịch hạt phủ kháng thể và dung dịch kháng thể đánh dấu enzym. Bóc lớp màng trong suốt ra khỏi vỏ immunoreaction cartridge trước khi lắp vỏ để đo. HBcrAg Pretreatment Solution: Đưa về nhiệt độ phòng (15-25 °C) và xác nhận tất cả các chất kết tủa (chất điện hoạt) trong dung dịch đã hòa tan. Trước khi đưa về nhiệt độ phòng, hãy ngưng sử dụng để loại bỏ chất kết tủa khỏi đáy bình chứa để chúng có thể hòa tan dễ dàng hơn HBcrAg Calibrators: Đưa về nhiệt độ phòng (15-25 °C) và thực hiện quy trình xử lý trước: Thêm một lượng HBcrAg Pretreatment Solution bằng với lượng mẫu hoặc thể tích HBcrAg calibrator đã pha vào mẫu hoặc HBcrAg calibrator trong cốc hoặc ống đựng mẫu. Ủ mẫu này trong 30 phút ở 60±4°C (tiền xử lý). Giữ mẫu ở nhiệt độ phòng trong 5 phút và không trộn để tránh tạo bong bóng.
2	HBcrAg sử dụng 130 µL mẫu đã xử lý trước cho mỗi xét nghiệm. Thể tích chết ít nhất lần lượt là 100 µL khi sử dụng cốc đựng mẫu và 250 µL khi sử dụng ống đựng mẫu với G System. Do đó, tổng thể tích mẫu cần thiết trên mỗi xét nghiệm là 230 µL trở lên đối với cốc đựng mẫu và 380 µL trở lên đối với ống đựng mẫu.

Các bước	Nội dung
HIỆU CHUẨN	
3	Hiệu chuẩn trong những trường hợp sau: 1) Trong xét nghiệm đầu tiên của HBcrAg 2) Khi thay HBcrAg Cartridges bằng một lô sản phẩm khác. 3) Khi kết quả kiểm soát chất lượng nằm ngoài khoảng đo. 4) Sau 30 ngày kể từ lần hiệu chuẩn trước. Cập nhật dữ liệu hiệu chuẩn khi cần. Chất chuẩn phải được thử hai lần. Giới hạn Đo: 3,0-7,0 LogU/mL (1,0-10000,0 kU/mL) <i>*Lưu ý rằng có thể có kết quả dưới 0,1 kU/mL HBcrAg, tức là ngoài giới hạn đo</i>
4	Nhập các yêu cầu xét nghiệm của HBcrAg Calibrators và mẫu
5	Kiểm tra lượng cần thiết sử dụng của HBcrAg Cartridges, Substrate Solution, Wash Solution pha loãng và đầu lấy mẫu đều đã được đặt vào hệ thống.
6	Nhấn nút [Assay start] (Bắt đầu xét nghiệm) để bắt đầu đo.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Lượng HBcrAg trong một mẫu sẽ được tự động tính từ dữ liệu hiệu chuẩn. Kết quả tính toán được đọc theo kU/mL và nên đổi ra LogU/mL. $1 \text{ kU/mL} = 3 \text{ LogU/mL}$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

275. HBeAg test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên e của virus viêm gan B trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với chất cộng hợp có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa: HBeAg: Kháng nguyên e của virus viêm gan B.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Lấy dụng cụ xét nghiệm ra khỏi túi đựng và đặt lên mặt khô, phẳng
- Nhỏ 100µl huyết thanh hoặc huyết tương vào giếng mẫu thử
- Ngay sau khi nhỏ mẫu thử, sẽ thấy màu tím di chuyển đến cửa sổ đọc kết quả nằm ở giữa dụng cụ xét nghiệm.
- Đọc kết quả trong vòng 5-20 phút. Không đọc kết quả sau 20 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

276. HBeAb test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể kháng kháng nguyên e của virus viêm gan B trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với chất cộng hợp có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa: HBeAb: Kháng thể kháng kháng nguyên e của virus viêm gan B.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Lấy dụng cụ xét nghiệm ra khỏi túi đựng và đặt lên mặt khô, phẳng
- Nhỏ 100µl huyết thanh hoặc huyết tương vào giếng mẫu thử
- Ngay sau khi nhỏ mẫu thử, sẽ thấy màu tía di chuyển đến cửa sổ đọc kết quả nằm ở giữa dụng cụ xét nghiệm.
- Đọc kết quả trong vòng 5-20 phút. Không đọc kết quả sau 20 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

277. HBeAg miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên HBeAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh (huyết tương) người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HBeAg bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Xét nghiệm định tính HBeAg
1	Chuẩn bị số giếng cần dùng, sơ đồ nhỏ mẫu, chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2	Nhỏ dung dịch loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng (tùy từng loại sinh phẩm).
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Chuẩn bị dung dịch rửa. Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
 - + NC: Độ hấp phụ của chứng âm.
 - + PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
 - + C.O: Giá trị ngưỡng thường được tính toán dựa trên giá trị trung bình của chứng âm. Công thức tính tùy thuộc từng nhà sản xuất sinh phẩm. VD $CO = NC_x + 0,025$
 - + NC_x : Giá trị trung bình của chứng âm.
 - + VD: $NC \leq 0,06$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + $PC \geq 0.8$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + VD cách tính: nếu có 3 giếng NC: $NC_x = NC \text{ OD} / 3$ (theo hướng dẫn của nhà sản xuất)
 - + VD: Loại chứng âm $NC > 0,06$ hoặc $NC > 25\% NC_x$. Chỉ được loại 1 chứng âm và tiếp tục tính kết quả theo 2 chứng âm còn lại (theo yêu cầu của từng nhà sản xuất sinh phẩm cụ thể).

- Đọc kết quả và biện luận
 - + Sự có mặt hay không có mặt của kháng nguyên HBeAg được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang (OD) của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng (C.O), tính tỷ lệ OD/C.O.
 - + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ OD/C.O < 1 được coi là âm tính.
 - + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ OD/C.O ≥ 1 được làm lại. Nếu xét nghiệm lần thứ hai giá trị tỷ lệ OD/C.O ≥ 1 . Mẫu huyết thanh coi là dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

278. HBeAb miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể HBeAb (Anti-HBe) của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HBeAb (Anti-HBe) bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Xét nghiệm định tính HBeAb (Anti-HBe)
1	Chuẩn bị số giếng cần dùng, sơ đồ nhỏ mẫu, chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2	Nhỏ dung dịch loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng (tùy từng loại sinh phẩm).
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Chuẩn bị dung dịch rửa. Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) hoặc tủ ấm 37 ⁰ C tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm hoặc các bước sóng theo khuyến cáo của nhà sản xuất bằng máy đo mật độ quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
 - + NC: Độ hấp phụ của chứng âm.
 - + PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
 - + C.O: Giá trị ngưỡng thường được tính toán dựa trên giá trị trung bình của chứng âm. Công thức tính tùy thuộc từng nhà sản xuất sinh phẩm. VD: sinh phẩm MONOLISA HBeAg/Ab Plus Bio-Rad
 - + $CO = NC_x \times 0.4$
 - + NC_x : Giá trị trung bình của chứng âm.
 - + VD: $NC \leq 0,09$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + $PC \geq 1.5$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + VD cách tính: nếu có 3 giếng NC: $NC_x = NC \text{ OD} / 3$ (theo hướng dẫn của nhà sản xuất)

- + VD: Loại chứng âm $NC > 0,06$ hoặc $NC > 25\% NC_x$. Chỉ được loại 1 chứng âm và tiếp tục tính kết quả theo 2 chứng âm còn lại (theo yêu cầu của từng nhà sản xuất sinh phẩm cụ thể).
- Đọc kết quả và biện luận
 - + Sự có mặt hay không có mặt của kháng nguyên HBeAb được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang (OD) của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng (C.O), tính tỷ lệ OD/C.O.

Mẫu huyết thanh :

- + Dương tính: khi có giá trị tỉ lệ $OD/C.O \leq 0,9$.
- + Âm tính: khi có giá trị tỉ lệ $OD/C.O \geq 1,1$.
- + $0,9 < \text{giá trị tỉ lệ} < 1,1$ OD/C.O nên làm lại xét nghiệm.

Trường hợp dương tính nên xét nghiệm lại 2 giếng. Nếu có ít nhất 1 giá trị dương, mẫu được coi là dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

279. HBeAg miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên HBeAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh (huyết tương) người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA (miễn dịch hóa phát quang, điện hóa phát quang hoặc miễn dịch huỳnh quang liên kết enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HBeAg bằng kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng PXN

Các bước	Xét nghiệm định tính HBeAg
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng, chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là HBeAg
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
 - + Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - + Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm.
- Kết quả và báo cáo
 - + Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên giá trị hiệu chuẩn của lô thuốc thử. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là có phản ứng hoặc không có phản ứng cùng với chỉ số ngưỡng (COI) của mẫu.

Kết quả được diễn giải như sau:

- + Nếu $COI < 1$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với HBeAg.
- + Nếu $COI \geq 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với HBeAg.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất
- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

280. HBeAb miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể HBeAb kháng kháng nguyên HBeAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA (miễn dịch hóa phát quang, điện hóa phát quang hoặc miễn dịch huỳnh quang liên kết enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HBeAb (Anti-HBe) bằng kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng loại sinh phẩm sử dụng của PXN

Các bước	Xét nghiệm định tính HBeAb
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng, chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là Anti-HBe
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

Nhận định kết quả xét nghiệm HBeAb

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.

- + Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và trong mỗi lô hóa chất HBeAb khác nhau có thể có sự thay đổi về giới hạn chứng
- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - + Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm
- Kết quả và báo cáo
 - + Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên giá trị hiệu chuẩn của lô thuốc thử. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là có phản ứng hoặc không có phản ứng cùng với chỉ số ngưỡng (COI) của mẫu.

Kết quả được diễn giải như sau:

- + Nếu mẫu xét nghiệm có $COI > 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với Anti-HBe.
- + Nếu mẫu xét nghiệm có $COI \leq 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với Anti-HBe.

Một số mẫu dương tính có thể cần kiểm tra lặp lại 2 lần trên cùng bộ sinh phẩm Anti-Hbe hoặc bộ sinh phẩm khác tùy theo quy trình biện luận kết quả của từng phòng xét nghiệm và từng trường hợp cụ thể :

- ✓ Nếu kết quả lặp lại 2 lần > 1 : Kết luận âm tính
- ✓ Nếu một trong hai lần lặp lại có kết quả ≤ 1.0 : Kết luận dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất

- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất
- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

281. HBV đo tải lượng Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và đo số lượng bản sao của virus viêm gan B trong một đơn vị thể tích huyết thanh hoặc huyết tương của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Các mẫu chuẩn được chạy cùng với mẫu bệnh phẩm và khi cường độ tín hiệu huỳnh quang của mẫu vượt qua đường tín hiệu huỳnh quang nền của phản ứng thì mẫu được xem là dương tính và ta lấy thời điểm vượt qua đó (biểu hiện qua giá trị chu kỳ ngưỡng – Ct) để so sánh với đường cong chuẩn (chứng chuẩn) được xây dựng từ chu kỳ ngưỡng của các mẫu chuẩn đã biết trước nồng độ từ đó suy ra số lượng DNA mẫu đưa vào phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml

- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. ANTOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- *Huyết tương*: Máu toàn phần được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA. Huyết tương được tách ra bằng cách ly tâm 800-1.600 x g trong 20 phút. Huyết tương có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết tương có thể được bảo quản ở -18°C lên đến một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.
- *Huyết thanh*: Máu toàn phần được thu nhận trong ống không có chất chống đông. Huyết thanh được tách ra bằng cách ly tâm 800-1.600 x g trong 20 phút. Huyết thanh có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết thanh có thể được bảo quản ở -18°C trong một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (µl)	25	50	100	200
Thể tích IS (µl)	2,5	5	10	20

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng chuẩn (standard) gồm 4 nồng độ để làm căn cứ tính nồng độ HBV trong mẫu và đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Hút 30 μ l Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Realtime-PCR*

Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Đánh số dãy ống PCR 0,2 ml theo số thứ tự mẫu bệnh phẩm.
- Thêm 10 μ l của mẫu axit nucleic của mẫu bệnh nhân hoặc Calibrator/ Control vào các ống PCR riêng lẻ. Thể tích cuối cùng của phản ứng sẽ là 40 μ l.
- Đóng các ống, ly tâm nhanh (spindown), đặt vào máy Real-time PCR theo sơ đồ vị trí mẫu.
- Chọn màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện HBV, màu HEX cho phát hiện chứng nội.
- Chọn chương trình luân nhiệt đã được cài đặt trên máy như sau:

* Chu kỳ nhiệt:

+ 1 chu kỳ: 37 $^{\circ}$ C/2 phút

+ 1 chu kỳ: 95 $^{\circ}$ C/10 phút

+ 45 chu kỳ: 95 $^{\circ}$ C/5 giây

60 $^{\circ}$ C/40 giây – đọc sản phẩm

72 $^{\circ}$ C/20 giây

- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

TT	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng chuẩn	+		Điều kiện chấp nhận của chứng chuẩn định lượng: $E = 90 - 115 \%$; $R^2 \geq 0,96 - 1$; Slope = $-3,3 - -4$; Nhưng tốt nhất là: $E = 95 - 110 \%$; $R^2 \geq 0,99 - 1$; Slope = $-3,3 - -3,6$
Chứng âm	-	+ (Ct < 38)	Có giá trị

- Các trường hợp cần kiểm tra lại:

TT	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương	-	+	Cần kiểm tra lại
Chứng âm	+	-	Cần kiểm tra lại

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

TT	Màu FAM	Màu HEX	KẾT QUẢ
1	+	$\pm$	Dương tính với <i>HBV</i>
2	-	+	Không phát hiện virus <i>HBV</i>
3	-	+ (Ct > 38)	Không có giá trị
4	-	-	Không có giá trị

- Với những mẫu dương tính, sử dụng công thức sau để tính nồng độ virus trong mẫu:

$$IU/ml = (SC \times EV)/IV$$

Trong đó: SC (Sample Concentration) = Nồng độ virus trong mẫu (IU/ μ l)

EV (Elution Volume) = Thể tích mẫu thu sau tách chiết (μ l)

IV (Isolation Volume) = Thể tích mẫu dùng để tách chiết (ml)

- Chứng nội chuẩn (IS) được thêm vào mẫu bệnh phẩm trước khi tách chiết để kiểm soát quá trình tách DNA và chạy Real-time PCR. Những mẫu có chứng nội chuẩn không đạt cần phải được kiểm tra lại từ bước tách chiết.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

282. HBV đo tải lượng hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và đo số lượng bản sao của virus viêm gan B trong một đơn vị thể tích huyết thanh hoặc huyết tương của người gồm tất cả 9 genotype trên hệ thống máy PCR xử lý mẫu và khuếch đại, phát hiện tự động hoàn toàn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Hệ thống máy PCR tự động dùng công nghệ vi hạt từ tính để hỗ trợ việc bắt giữ, rửa, và tách rửa acid nucleic. Acid nucleic tinh sạch thu được sau đó sẽ được kết hợp với thuốc thử khuếch đại/phát hiện HBV và chuyển sang một ống phản ứng. Ống này sau đó được chuyển sang một bộ phận khuếch đại/phát hiện để thực hiện khuếch đại PCR, và phát hiện tín hiệu huỳnh quang của HBV theo thời gian thực. Hai nồng độ mẫu chuẩn được xử lý trong suốt quy trình chuẩn bị mẫu và PCR để tạo đường cong hiệu chuẩn. Nồng độ DNA của HBV trong các mẫu xét nghiệm và mẫu chứng sau đó được tính toán từ đường cong hiệu chuẩn đã lưu. Trong mỗi lần xử lý mẫu chứng, một mẫu chứng âm tính, một mẫu chứng dương tính nồng độ thấp, một mẫu chứng dương tính nồng độ cao được xử lý trong suốt quá trình chuẩn bị mẫu và PCR giống như quy trình thực hiện với các mẫu xét nghiệm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy PCR tự động và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 180 phút (3 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ly tâm ống máu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Chuẩn bị hóa chất

- Trước khi nạp vào hệ thống máy, cần chuẩn bị hóa chất và nạp hóa chất vào máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

b. Chuẩn bị mẫu

Trước khi chạy mẫu xét nghiệm:

- Kiểm tra tình trạng mẫu chuẩn và mẫu chứng. Từ màn hình Tạo lệnh, chọn xét nghiệm cần chạy (HBV).
- Hệ thống máy sẽ theo dõi thời gian bảo quản trên hệ thống của các thuốc thử khuếch đại, mẫu chứng, mẫu chuẩn, và mẫu xét nghiệm trong khi ở trên thiết bị. Hệ thống máy sẽ không cho phép dùng các thuốc thử khuếch đại, mẫu chứng, mẫu chuẩn hoặc xử lý các mẫu xét nghiệm đã quá thời gian tối đa lưu trên hệ thống. Các ống tube lấy mẫu với huyết thanh và huyết tương đã được tách riêng và các ống chuyển mẫu có thể được đặt trên giá mẫu nằm trên hệ thống trong tối đa 4 giờ trước khi xử lý.

Quy trình pha loãng mẫu (Không bắt buộc):

Các mẫu xét nghiệm có thể được pha loãng thủ công để xét nghiệm trên Hệ thống máy tự động bằng Bộ pha loãng của nhà sản xuất theo bảng bên dưới.

- + Thể tích nhỏ $\geq 140 \mu\text{L}$: 1:2,5
- + 50 đến 139 μL : 1:50
- + Kết quả $> \text{ULOQ} \geq 50 \mu\text{L}$: 1:50

Người vận hành phải chọn hệ số pha loãng trong thẻ Specimen của màn hình tạo lệnh (Create Order) từ phần mềm hệ thống. Hệ thống sẽ dùng hệ số pha loãng được chọn để tự động tính toán và báo cáo kết quả của mẫu xét nghiệm không pha.

LƯU Ý: Sau khi pha loãng, mẫu xét nghiệm phải được nạp vào hệ thống trong vòng 2 giờ.

- Nạp ống tube pha loãng đã được dán mã lên giá mẫu.

c. Tách chiết DNA vận hành máy PCR tự động

- Thực hiện bảo trì máy;
- + Kiểm tra trạng thái bảo trì ở mục “Overview > Procedures >
- + Thực hiện bảo trì nếu đến hạn:

- Chọn “Monthly” nếu thực hiện bảo trì hàng tuần.
- Chọn “Weekly” nếu thực hiện bảo trì hàng tuần.
- Chọn “To do” nếu thực hiện bảo trì hàng ngày.
- Chọn “As Needed” nếu thực hiện bảo trì khi cần thiết.

- Chuẩn bị hóa chất và vật tư tiêu hao:

Lấy hóa chất và vật tư tiêu hao cần thiết. Tất cả hóa chất cần được ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi nạp vào máy

- Bắt đầu mở chạy:

Từ màn hình Create Order (Tạo lệnh), chọn xét nghiệm cần chạy (HBV). Các ống tube mẫu xét nghiệm cần đáp ứng các yêu cầu về thể tích mẫu tối thiểu và việc sử dụng nắp ống tube khi nạp vào Hệ thống. Các ống tube lấy mẫu với huyết thanh và huyết tương đã được tách riêng và các ống chuyển mẫu có thể được đặt trên giá mẫu nằm trên hệ thống trong tối đa 4 giờ trước khi xử lý.

- Bảo dưỡng cuối ngày: Hoàn tất công việc vệ sinh máy.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

a. Hiệu chuẩn xét nghiệm

Khi thực hiện hiệu chuẩn xét nghiệm:

- Các giá trị nồng độ của từng lô có thể tự động được nhập vào Hệ thống thông qua phần mềm sau khi quét mã vạch của ống chứa mẫu chuẩn (HBV CAL A và HBV CAL B) hoặc mẫu chứng (HBV NEG CTRL, HBV LOW POS CTRL, và HBV HIGH POS CTRL).
- Cũng có thể lấy giá trị nồng độ của từng lô từ cổng thông tin khách hàng của hãng sản xuất cung cấp và được nhập vào Hệ thống thông qua thẻ nhớ USB.
- Hệ thống sẽ xử lý 3 mẫu lặp lại từ mỗi ống mẫu chuẩn. Các dữ liệu đầu ra của 2 mẫu chuẩn sẽ được dùng để tạo đường cong hiệu chuẩn (nồng độ HBV theo lô so với chu kỳ ngưỡng [Ct] mà tại đó mức phản ứng của tín hiệu huỳnh quang được phát hiện). Độ dốc và hệ số chặn của đường cong hiệu chuẩn được tính toán và lưu trên thiết bị. Sau khi đường cong hiệu chuẩn của xét nghiệm được chấp nhận và lưu, tất cả các mẫu sau đó sẽ được xét nghiệm mà không cần hiệu chuẩn thêm trừ khi có bất cứ tình huống nào sau đây xảy ra:

- + Sử dụng lô AMP Kit mới.

- + Sử dụng lô Sample Prep Kit 2 hoặc Lysis Solution mới.
- + Đường cong hiệu chuẩn của xét nghiệm đã hết hạn (06 tháng).

b. Phát hiện ức chế

- Một thông số xác thực xét nghiệm đó là chu kỳ ngưỡng [Ct] của mẫu chứng nội bộ (IC) được thiết lập trong quá trình chạy mẫu chuẩn. Một lượng IC phù hợp đã xác định được cho vào từng mẫu xét nghiệm, từng mẫu chuẩn, và mẫu chứng ngay từ lúc bắt đầu chuẩn bị mẫu và tính toán trên hệ thống để chứng minh việc xử lý mẫu đúng quy trình và tính xác thực của xét nghiệm.
- Giá trị IC Ct trung vị từ các mẫu chuẩn sẽ thiết lập khoảng xác thực của IC Ct cho các mẫu xét nghiệm và mẫu chứng sau đó. Một mã thông báo (Message Code) được gán cho một mẫu xét nghiệm hoặc mẫu chứng khi giá trị IC Ct của nó nằm ngoài khoảng xác thực của IC Ct. Khi một giá trị IC Ct vượt giới hạn trên của khoảng xác thực IC Ct, là dấu hiệu cho thấy các điều kiện xét nghiệm bất thường đã xảy ra, ví dụ như sự ức chế.

c. Mẫu chứng

- Khuyến cáo xét nghiệm một mẫu chứng âm, chứng dương thấp, và chứng dương cao, tối thiểu một lần mỗi 48 giờ, để theo dõi hiệu quả của xét nghiệm và hệ thống máy. Phải có được các kết quả hợp lệ cho tất cả các mức mẫu chứng trước khi báo cáo kết quả mẫu xét nghiệm. Các mẫu chứng xét nghiệm cũng được xét nghiệm sau mẫu chuẩn và cần có các kết quả mẫu chứng hợp lệ để thiết lập một đường cong hiệu chuẩn mới.
- Để biết thông tin giải quyết vấn đề: Cờ báo lỗi mẫu sẽ hiển thị khi một kết quả mẫu chứng không hợp lệ. Tất cả các mẫu xét nghiệm đã được xử lý sau khi mẫu chứng không hợp lệ phải được xét nghiệm lại.
- Giá trị định lượng chấp nhận được nếu không xuất hiện tín hiệu cờ báo cho cả 3 chứng: chứng âm, chứng dương tính thấp, chứng dương tính cao. Các chứng có giá như sau:
 - + Chứng âm: không phát hiện.
 - + Chứng dương: nằm trong khoảng cho phép của nhà sản xuất (đặc hiệu với từng lô thuốc thử) và không xuất hiện tín hiệu cờ báo.
- Không nhận các kết quả của chứng không có giá trị khi xuất hiện thông báo lỗi (cờ báo flags):
 - + Chứng âm: Nếu chứng âm có tín hiệu cờ báo là invalid thì phải thực hiện lại xét nghiệm cả chứng và toàn bộ lô bệnh phẩm.
 - + Chứng dương: Nếu một hoặc cả hai chứng dương xuất hiện cờ báo invalid thì phải làm lại xét nghiệm toàn bộ lô bệnh phẩm.
 - + Đánh giá theo yêu cầu phòng xét nghiệm

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tính toán

Các kết quả định lượng được báo cáo cho mẫu huyết thanh và huyết tương với nồng độ HBV nằm trong khoảng định lượng của xét nghiệm. Nồng độ HBV DNA trong một mẫu huyết tương do phần mềm hệ thống tính toán từ đường cong hiệu chuẩn. Hệ thống máy báo cáo kết quả theo đơn vị International Units là IU/mL hoặc Log [IU/mL].

Đối với các mẫu huyết tương được xét nghiệm với quy trình pha loãng mẫu, hệ thống sẽ tính toán và báo cáo nồng độ nguyên chất (tức là nồng độ trước khi pha loãng), bằng cách dùng hệ số pha loãng do người dùng chọn.

b. Diễn giải kết quả

- Mẫu không pha loãng: hệ thống máy sẽ báo cáo kết quả và diễn giải:

Giá trị trên máy	Trả lời kết quả
Not Detected	Không phát hiện thấy HBV-DNA
< 1,00 IU/ml	< 10 IU/ml
1,00 đến 9,00 Log IU/mL	nhận những kết quả trong giới hạn này
> 9,00 Log IU/mL	> 10 ⁹ IU/ml
Invalid	Không giá trị, chạy lại mẫu bệnh phẩm

- Mẫu pha loãng

- + Đối với các mẫu pha loãng tỉ lệ 1 : 2,5 hoặc 1 : 50, Hệ thống sẽ báo cáo một kết quả định lượng là nồng độ HBV DNA trong các mẫu trước khi pha loãng và cờ DIL cho biết rằng mẫu đã được pha loãng.
- + Đối với các mẫu đã được pha loãng mà máy báo kết quả tín hiệu HBV không được phát hiện: Không báo cáo kết quả và phải được kiểm tra lại với các mẫu chưa pha loãng hoặc từ một mẫu bệnh phẩm mới.

+ Mẫu xét nghiệm có tỉ lệ pha loãng 1 : 2,5 Hệ thống báo cáo:

< 1,40 Log IU/mL	Phát hiện < LLOQ	DIL
1,40 đến 9,40 Log IU/mL		DIL
> 9,40 Log IU/mL	> ULOQ	DIL

+ Mẫu xét nghiệm có tỉ lệ pha loãng 1 : 50 Hệ thống báo cáo

< 2,70 Log IU/mL	Phát hiện < LLOQ	DIL
2,70 đến 10,70 Log IU/mL		DIL
> 10,70 Log IU/mL	> ULOQ	DIL

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kết quả đo tải lượng HBV bị ảnh hưởng khi có các mảnh vụn trong bệnh phẩm huyết thanh và huyết tương (ví dụ: cục máu đông, sợi fibrin)
- Kết quả có thể âm tính giả trong các trường hợp sau:
 - + Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng: heparin
 - + Môi trường:
 - Sử dụng quá nhiều a-xít hypochlorous trong khử nhiễm phòng thí nghiệm.
 - Sử dụng găng có bột talc khi thực hiện xét nghiệm.
- Kết quả có thể dương tính giả trong các trường hợp sau:
 - + Có sự lây nhiễm chéo giữa các mẫu bệnh phẩm.
 - + Lây nhiễm các sản phẩm khuyếch đại từ lần phản ứng trước.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

283. HBV genotype Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Để xác định genotype của virus viêm gan B trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- **Huyết tương:** Máu toàn phần được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA. Huyết tương được tách ra bằng cách ly tâm 800-1.600 x g trong 20 phút. Huyết tương có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết tương có thể được bảo quản ở -18°C lên đến một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.
- **Huyết thanh:** Máu toàn phần được thu nhận trong ống không có chất chống đông. Huyết thanh được tách ra bằng cách ly tâm 800-1.600 x g trong 20 phút. Huyết thanh có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết thanh có thể được bảo quản ở -18°C trong một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần, cất PCR mix lại ngay rồi mới thực hiện các bước tiếp theo.
- Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Viết ký hiệu mẫu trên thân phần thân sát nắp.
- Cho 5µl dịch DNA vào từng tube HBV Genotype A rPCR Mix, HBV Genotype B rPCR Mix, HBV Genotype C rPCR Mix. Phải kiểm tra chắc chắn phần dịch trong tip phải được cho hết vào tube. Thực hiện mẫu nào, chỉ mở nắp tube tương ứng. Thực hiện xong đóng thật kỹ nắp tube ngay để tránh nguy cơ ngoại nhiễm. Sau đó đặt các tube vào máy realtime PCR.

- Bật máy realtime PCR, nhất là đèn của đầu đọc realtime ít nhất 15 phút trước khi chạy chương trình. Bật máy tính và khởi động chương trình realtime PCR. Phải kiểm tra chắc chắn máy realtime PCR và máy tính đã kết nối với nhau.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy realtime PCR.
- Với mẫu: Chọn loại mẫu là “Unknown”. Đặt tên hoặc số tương ứng với ký hiệu của mẫu.
- Với chứng dương và âm: Chọn loại mẫu là “Unknown”. Đặt tên “Chứng dương”, “Chứng Âm” tương ứng.
- Chọn màu “FAM” cho tất cả các mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy realtime PCR hoạt động:

1 chu kỳ: 95°C-5 phút;

40 chu kỳ: 95°C-15 giây, 60°C-1 phút (**chọn đọc kết quả tại bước này**).

- Lưu file dữ liệu vào máy tính.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.
- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

Mẫu chứng	DIỄN GIẢI
Chứng dương	Dương tính với cả 3 genotype
Chứng âm	Âm tính

4.2.2. Đọc kết quả

Nên **chọn từng mẫu** và phân tích ở chế độ **dữ liệu thô** để có kết quả chính xác nhất.

- Mẫu có đường biểu diễn dương tính tại vị trí tương ứng với genotype nào thì kết luận mẫu nhiễm genotype đó.
- Một mẫu có thể đồng nhiễm nhiều genotype. Trường hợp mẫu đồng nhiễm nhiều genotype, nếu tín hiệu dương tính rõ ràng và bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước ứng với genotype nào thì kết luận mẫu nhiễm genotype đó, ngược lại không kết luận dương tính với tín hiệu dương tính không rõ ràng và bắt đầu từ sau chu kỳ 36.
- Mẫu có đường biểu diễn âm tính với tất cả các genotype thì kết luận: “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.2. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.3. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

284. HCV genotype Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Để xác định genotype của virus viêm gan C trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR, là phản ứng PCR trong đó phân tử RNA được phiên mã ngược tạo cDNA và kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Huyết tương: Máu toàn phần được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA. Huyết tương được tách ra bằng cách ly tâm 800-1.600 x g trong 20 phút. Huyết tương có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết tương có thể được bảo quản ở -18°C lên đến một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.
- Huyết thanh: Máu toàn phần được thu nhận trong ống không có chất chống đông. Huyết thanh được tách ra bằng cách ly tâm 800-1.600 x g trong 20 phút. Huyết thanh có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết thanh có thể được bảo quản ở -18°C trong một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng RT-PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần, cất PCR mix lại ngay rồi mới thực hiện các bước tiếp theo.
- Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Viết ký hiệu mẫu trên thân phần thân sát nắp.
- Cho 15µl chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube RT Mix. Phải kiểm tra chắc chắn phần dịch trong tip phải được cho hết vào tube. Thực hiện mẫu

nào, chỉ mở nắp tube tương ứng. Thực hiện xong đóng thật kỹ nắp tube ngay để tránh nguy cơ ngoại nhiễm. Sau đó đặt các tube vào máy PCR.

- Lập chương trình “Protocol” cho máy realtime PCR hoạt động: 250C - 5’, 420C - 30’, 850C - 5’, giữ ở 40C. Chọn chức năng chờ cho đến khi “Heat lid” đạt 105oC thì chương trình luân nhiệt mới bắt đầu.
- Sản phẩm cDNA được dùng để thực hiện phản ứng PCR.
- Nếu chưa thực hiện phản ứng PCR ngay, phải bảo quản cDNA ở -20oC

c. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần, cất PCR mix lại ngay rồi mới thực hiện các bước tiếp theo.
- Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Viết ký hiệu mẫu trên thân phần thân sát nắp.
- Cho 2,5µl dịch cDNA từ phản ứng RT-PCR vào từng tube HCV Genotype 1 & 6 rPCR Mix, HCV Genotype 2 & 3 rPCR Mix. Phải kiểm tra chắc chắn phần dịch trong tip phải được cho hết vào tube. Thực hiện mẫu nào, chỉ mở nắp tube tương ứng. Thực hiện xong đóng thật kỹ nắp tube ngay để tránh nguy cơ ngoại nhiễm. Sau đó đặt các tube vào máy realtime PCR.
- Bật máy realtime PCR, nhất là đèn của đầu đọc realtime ít nhất 15 phút trước khi chạy chương trình. Bật máy tính và khởi động chương trình realtime PCR. Phải kiểm tra chắc chắn máy realtime PCR và máy tính đã kết nối với nhau.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy realtime PCR.
- Với mẫu: Chọn loại mẫu là “Unknown”. Đặt tên hoặc số tương ứng với ký hiệu của mẫu.
- Với chứng dương và âm: Chọn loại mẫu là “Unknown”. Đặt tên “Chứng dương”, “Chứng Âm” tương ứng.
- Chọn màu “FAM” và “HEX” cho tất cả các mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy realtime PCR hoạt động:

1 chu kỳ: 95⁰C-5 phút;

40 chu kỳ: 95⁰C-15 giây, 65⁰C-1 phút (**chọn đọc kết quả tại bước này**).

- Lưu file dữ liệu vào máy tính.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

Mẫu chứng	FAM	HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương	Đường biểu diễn huỳnh quang tuyến tính vượt quá tín hiệu nền		Dương tính với genotype 2 và 6
		Đường biểu diễn huỳnh quang tuyến tính vượt quá tín hiệu nền	Dương tính với genotype 1 và 3
Chứng âm	Đường biểu diễn huỳnh quang âm tính		Âm tính

4.2.2. Đọc kết quả

Nên **chọn từng mẫu** và phân tích ở chế độ **dữ liệu thô** để có kết quả chính xác nhất.

- Mẫu có đường biểu diễn dương tính tại vị trí tương ứng với genotype nào thì kết luận mẫu nhiễm genotype đó.
- Một mẫu có thể đồng nhiễm nhiều genotype. Trường hợp mẫu đồng nhiễm nhiều genotype, nếu tín hiệu dương tính rõ ràng và bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước ứng với genotype nào thì kết luận mẫu nhiễm genotype đó, ngược lại không kết luận dương tính với tín hiệu dương tính không rõ ràng và bắt đầu từ sau chu kỳ 36.
- Mẫu có đường biểu diễn âm tính với tất cả các genotype thì kết luận: “HCV Genotype khác ngoài 4 type 1, 2, 3 và 6”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.2. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.3. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

285. HPV genotype Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính, đồng thời nhiều genotype của HPV (gồm 19 typ nguy cơ cao và 9 typ nguy cơ thấp) trong mẫu bệnh phẩm từ đường sinh dục của người bằng kỹ thuật real-time PCR. Bao gồm:

- Bộ A: 14 type nguy cơ cao: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.
- Bộ B: 5 type nguy cơ cao: 26, 53, 69, 73, 82 & 9 type nguy cơ thấp: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR đa môi cho phép khuếch đại, phát hiện đồng thời các nucleic acid khác nhau của 19 type nguy cơ cao và 9 type nguy cơ thấp và chứng nội (IC). Bộ kit có thể thể hiện nhiều xét nghiệm bằng phương pháp End point-CMTA (End point-Catcher Melting Temperature Analysis) hoặc cyclic-CMTA (cyclic-Catcher Melting Temperature Analysis) dựa trên công nghệ TOCE có thể phát hiện nhiều tác nhân gây bệnh trong cùng một kênh màu huỳnh quang bằng máy real-time PCR. Công nghệ TOCE của xét nghiệm được thiết kế để không bị ảnh hưởng bởi sự biến động trình tự, vì vậy nó đảm bảo giá trị nhiệt độ nóng chảy không thay đổi.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng

- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C

- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 μ l đến 1000 μ l
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch phết cổ tử cung, tế bào ống cổ tử cung, dịch tổn thương sùi mào gà.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- 10 μ L IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Chạy real-time One-step RT-PCR:

- Bật thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix, cụ thể:

5 μ L	4X HPV28 A TOM hoặc B TOM
5 μ L	EM1
5 μ L	RNase-free water
15 μ L	Tổng thể tích Mastermix

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng.

- Chia 15 µl MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

- Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.
- Thêm 5 µl sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng HPV28 (PC1, PC2 và PC3) vào mỗi ống MasterMix.
- Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.
- Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.
- Cài đặt chu trình nhiệt trên máy RT-PCR.

Chu trình nhiệt như sau:

+ CMTA chu kỳ (Phân tích điểm nóng chảy 3 điểm):

Step	Temperature	Duration	No. of cycles
1	50°C	4 min	
2	95°C	15 min	
3	95°C	30 sec	30
4	60°C	1 min	
5	72°C	30 sec	
6	GOTO 3, 29 more times		
7	55°C	30 sec	
8*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		
9	95°C	30 sec	10
10	60°C	1 min	
11	72°C	30 sec	
12	GOTO 9, 9 more times		
13	55°C	30 sec	
14*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		
15	95°C	30 sec	10
16	60°C	1 min	
17	72°C	30 sec	
18	GOTO 15, 9 more times		
19	55°C	30 sec	
20*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		

Ghi chú: *Ghi nhận tín hiệu ở bước 8, 14 và 20. Màu huỳnh quang được phát hiện ở điểm nóng chảy.

+ CMTA điểm cuối (Phân tích nóng chảy 1 thời điểm)

Step	Temperature	Duration	No. of cycles
1	50°C	4 min	
2	95°C	15 min	
3	95°C	30 sec	50
4	60°C	1 min	
5	72°C	30 sec	
6	GOTO 3, 49 more times		
7	55°C	30 sec	
8*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		

Ghi chú: *Ghi nhận tín hiệu ở bước 8. Màu huỳnh quang được phát hiện ở điểm nóng chảy

- Cài đặt sơ đồ mẫu
 - + Chọn kênh màu: FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 và Quasar 705.
 - + Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương.

Lưu ý: chọn loại đĩa: BR White

- Bắt đầu chạy chương trình. Lưu file dữ liệu vào thư mục thích hợp.
- Bắt đầu quá trình chạy realtime PCR

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng nội (IC) được bổ sung để kiểm soát quá trình tách chiết acid nucleic và phản ứng PCR. Nếu chứng nội dương tính chứng tỏ quá trình tách chiết và phản ứng PCR thành công. Tuy nhiên sự phát hiện chứng nội ở kênh Quasar 670 là không cần thiết nếu kết quả dương tính với tác nhân đích. Hiệu giá cao hoặc yếu tố phân tích khác có thể làm giảm hoặc làm mất tín hiệu IC.
- Chứng dương và chứng âm được bổ sung trong mỗi mẻ chạy để kiểm soát chất lượng sinh phẩm và quá trình chạy mẫu.

4.2.2. Đọc kết quả

a. Xem và in kết quả

- Khi quá trình Real time -PCR kết thúc:
 - + Click vào Melt curve tab
 - + Chỉ chọn Quasar670 và điều chỉnh đường ngưỡng của đỉnh nóng chảy về 0
 - + Chọn Seegene Export và xuất kết quả vào thư mục đích.

- Phân tích kết quả trong Seegene Viewer
 - + Mở chương trình Seegene Viewer, chọn Open để mở file đã được lưu trong “MeltStep8”.
 - + Chọn loại kit xét nghiệm trong PRODUCT. Lưu ý xác định loại ống khi chọn bộ kit xét nghiệm (dây 8 hoặc đĩa 96).
 - + Kiểm tra kết quả ở mỗi vị trí.

b. Diễn giải kết quả

Kết quả dương khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) ≤ 42 .

Kết quả âm khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) > 42 hoặc N/A.

Kết quả HPV	Kết quả IC	Diễn giải kết quả
+++ / +++ / +	+++ / +++ / +/-	HPV (+), ghi nhận typ HPV
-	+++ / ++	Không phát hiện virus -> Âm tính
-	+/-	Không có giá trị -> Kiểm tra lại

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

- + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
- + Chỉ sử dụng tip cổ đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
- + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
- + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.3. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

286. Virus genotype Real-time PCR (cho một loại Vi sinh vật)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định genotype của virus trong mẫu huyết tương của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HCV Genotype Plus Real-TM (VD hoặc tương đương)
- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương tách từ máu toàn phần có chất chống đông EDTA.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

a. Tách chiết acid nucleic

- Trước khi tách chiết cho chứng nội (IC) vào từng giếng nhỏ bệnh phẩm.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng phiên mã ngược

- Rã đông hóa chất
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Chia 10 µl hỗn hợp phản ứng trên vào mỗi tuýp đã đánh dấu mã bệnh phẩm.
- Cho 10 µl RNA đã tách chiết vào tuýp hỗn hợp phản ứng tương ứng.
- Đặt tuýp vào máy luân nhiệt và ủ ở 37°C trong 30 phút.
- Pha loãng 1/2 mẫu cDNA thu được với dung dịch TE. Trộn đều rồi ly tâm spindown.

c. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Rã đông hóa chất.

* Chuẩn bị 04 ống cho mỗi mẫu bệnh phẩm.

* Chuẩn bị Master mix cho phản ứng Realtime PCR với số lượng ống như sau:

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

* Chuẩn bị 04 loại Master Mix "1b/3", "1a/2", "4/IC" and "5a/6" với tỷ lệ các thành phần như hướng dẫn của nhà sản xuất:

STT	Thành phần	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)	Thể tích cho N phản ứng (μl)
1	PCR-mix-1-FRT HCV genotype 1b/3 (hoặc 1a/2 or 4/IC or 5a/6)	10	10*N
2	RT-PCR-mix-2-TM	5	5,0*N
3	TaqF DNA Polymerase	0,5	0,5*N
	Thể tích MMX/ống	15,5	15,5*N

- Vortec và ly tâm ống MMX khoảng 2-3 giây.
- Chia 15 μl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương (4 ống chứng dương tương ứng với 04 typ), chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Thêm 10 μl cDNA vào ống tương ứng. Trộn đều.
- Đóng nắp và chuyển các ống vào máy Real - time PCR theo sơ đồ vị trí mẫu.
- Chọn màu FAM, HEX cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình "Protocol" cho máy realtime PCR hoạt động (tuỳ theo máy real-time PCR sử dụng để cài đặt chu trình nhiệt phù hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

287. HBV kháng thuốc Real-time PCR (cho 1 loại thuốc)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện đột biến kháng thuốc của virus viêm gan B trong huyết thanh hoặc huyết tương của người bằng kỹ thuật Real-time PCR (ví dụ: Lamivudine hoặc Adefovir,...)

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ vi sinh hoặc bác sỹ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml

- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Huyết tương: Máu toàn phần được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA. Huyết tương được tách ra bằng cách ly tâm 3000 vòng trong 15 phút. Huyết tương có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết tương có thể được bảo quản ở -18°C lên đến một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.

Huyết thanh: Máu toàn phần được thu nhận trong ống không có chất chống đông. Huyết thanh được tách ra bằng cách ly tâm 3000 vòng trong 15 phút. Huyết thanh có thể được bảo quản trong ống vô trùng ở 2-8°C trong 3 ngày. Ngoài ra, huyết thanh có thể được bảo quản ở -18°C trong một tháng hoặc bảo quản ở -70°C trong 1 năm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan. Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần, cất PCR mix lại ngay rồi mới thực hiện các bước tiếp theo.
- Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Nếu máy realtime PCR đọc từ đáy của tube: Viết kí hiệu mẫu trên nắp hoặc trên thân phần gần sát nắp. Nếu máy realtime PCR đọc từ nắp của tube: Viết kí hiệu mẫu trên thân phần thân sát nắp.
- Cho 5µl chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube AdeR rt181T rPCR Mix, AdeR rt181V rPCR Mix và AdeR rtN236T rPCR Mix (mỗi mẫu, kể cả chứng +/- đều phải cho vào cả 3 tube) hoặc vào từng tube LamR 180rt rPCR Mix, LamR 204rtI rPCR Mix và LamR 204rtV rPCR Mix. Phải kiểm tra chắc chắn phần dịch trong tip phải được cho hết vào tube. Thực hiện mẫu nào, chỉ mở nắp tube tương ứng. Thực hiện xong đóng thật kỹ nắp tube ngay để tránh nguy cơ ngoại nhiễm. Xong, đặt các tube vào máy realtime PCR.
- Bật máy realtime PCR, nhất là đèn của đầu đọc realtime ít nhất 15 phút trước khi chạy chương trình. Bật máy tính và chờ cho máy tính khởi động xong, gọi chương trình realtime PCR lên. Phải kiểm tra chắc chắn máy realtime PCR và máy tính đã

kết nối với nhau (xem HDSD máy realtime PCR). Chọn chức năng chờ cho đến khi “Heat lid” đạt 105°C thì chương trình luân nhiệt mới bắt đầu.

- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy realtime PCR.
- Với mẫu: Chọn loại mẫu là “Unknown”. Đặt tên hoặc số tương ứng với ký hiệu của mẫu. Mỗi mẫu có 6 tube tương ứng:
 - + 3 tube đặt tên “Ký hiệu mẫu - AdeR rt181T”, “Ký hiệu mẫu - AdeR rt181V”, “Ký hiệu mẫu - rtN236T”.
 - + 3 tube đặt tên “Ký hiệu mẫu - LamR 180rt”, “Ký hiệu mẫu - LamR 204rtI” và “Ký hiệu mẫu - LamR 204rtV”.
- Với chứng dương và âm: Để kiểm tra, nên chọn loại mẫu là “Unknown”, không nên chọn “PTC - Possitive Control” và “NTC - Negative Control”. Đặt tên “Chứng dương”, “Chứng Âm” tương ứng.
- Chọn màu “FAM” cho tất cả các mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy realtime PCR hoạt động:
 - + **1 chu kỳ:** 95°C-5 phút;
 - + **40 chu kỳ:** 95°C-15 giây
 - 65°C-1 phút (chọn đọc kết quả tại bước này).**

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

- + Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (**đường biểu diễn dương tính**) với cả 3 vị trí đột biến.
- + Chứng âm có đường biểu diễn thẳng và không vượt qua tín hiệu nền (**đường biểu diễn âm tính**)

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu có đường biểu diễn dương tính tại vị trí tương ứng với vị trí đột biến nào thì kết luận mẫu đột biến tại vị trí đó. Một mẫu có thể có nhiều vị trí đột biến.

- + Trường hợp mẫu có nhiều vị trí đột biến, nếu tín hiệu dương tính rõ ràng và bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước ứng với vị trí đột biến nào thì kết luận mẫu đột biến tại vị trí đó.
- + Không kết luận dương tính với tín hiệu dương tính không rõ ràng và bắt đầu từ sau chu kỳ 36. Những trường hợp này nên lặp lại xét nghiệm.
- Mẫu có đường biểu diễn âm tính với tất cả các vị trí đột biến thì kết luận: “Mẫu không có đột biến kháng Adefovir tại vị trí rt181T, rt181V và rtN236T”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

288. HCV Ab test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể kháng HCV có trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa

- Vạch C (Control line): Vạch chứng
- Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất..

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất được ví dụ ở trên.

Bộ sinh phẩm Anti HCV

- Lấy dụng cụ xét nghiệm ra khỏi túi đựng và đặt lên bề mặt khô, phẳng.

- Dùng pipet vi lượng, nhỏ 10 μ l huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần vào giếng mẫu thử (S).
 - Nhỏ thêm 4 giọt dung môi vào trong giếng mẫu thử.
 - Ngay sau khi nhỏ mẫu thử, sẽ thấy màu tím di chuyển ngang cửa sổ kết quả nằm ở chính giữa dụng cụ xét nghiệm.
 - Đọc kết quả trong vòng 5-20 phút.
- * Chú ý: Không đọc kết quả sau 20 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ hoặc hồng: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

Hiện tượng	Kết quả
Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu tím	Dương tính
Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (kiểm tra C)	Âm tính
Trên thanh thử không xuất hiện vạch C	Test hồng

Lưu ý: Nếu vạch control không chuyển sang màu tím xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.

- Cạn phân che giếng S, khuấy mẫu đã nhỏ ở giếng (S) bằng que. Nếu xét nghiệm vẫn không thực hiện được, nhỏ thêm 1 giọt dung môi cho đến khi nhìn thấy dung dịch lỏng di chuyển đến vùng phản ứng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO.

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

289. HCV Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể Anti-HCV của virus viêm gan C (HCV) trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA .

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HCV bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti HCV
1	Chuẩn bị số giếng cần dùng, sơ đồ nhỏ mẫu, chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2	Nhỏ dung dịch loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng (tùy từng loại sinh phẩm).
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Chuẩn bị dung dịch rửa. Rửa tám phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tám phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) hoặc trong tủ ấm 37 ⁰ C tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm hoặc bước sóng khác theo khuyến cáo của nhà sản xuất bằng máy đo mật độ quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
 - + NC: Độ hấp phụ của chứng âm.
 - + PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
 - + C.O: Giá trị ngưỡng thường được tính toán dựa trên giá trị trung bình của chứng dương. Công thức tính tùy thuộc từng nhà sản xuất sinh phẩm. VD sinh phẩm MONOLISA Anti – HCV PLUS Bio-Rad :
 - + PC_x: Giá trị trung bình của chứng dương.
 - + $NC \leq 0,15$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + $1.000 \leq PC \leq 2.400$ (theo yêu cầu của nhà sản xuất).
 - + VD cách tính PC_x nếu có 3 giếng PC: $PC_x = PC \text{ OD} / 3$ (theo hướng dẫn của nhà sản xuất)
 - + Loại chứng dương $PC < 1.0$ hoặc $PC > 2.4$ hoặc $PC > 30\% PC_x$. Chỉ được loại 1 chứng âm và tiếp tục tính kết quả theo 2 chứng âm còn lại (theo yêu cầu của từng nhà sản xuất sinh phẩm cụ thể).

- + Tính CO: $CO = PC_x/5$
- Đọc kết quả và biện luận
 - + Sự có mặt hay không có mặt của kháng nguyên Anti-HCV được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang (OD) của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng (C.O), tính tỷ lệ OD/C.O.
 - + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ $OD/C.O < 1$ được coi là âm tính với Anti-HCV
 - + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ $OD/C.O \geq 1$ được làm lại. Nếu lần xét nghiệm thứ 2 giá trị tỷ lệ ≥ 1 . Mẫu huyết thanh coi là dương tính với Anti-HCV.
 - + Mẫu huyết thanh có $0,9 < \text{tỷ lệ} < 1$. xét nghiệm lại 2 lần:
 - ✓ Giá trị tỷ lệ OD/C.O của xét nghiệm lặp lại ≥ 1 : mẫu được coi là dương tính.
 - ✓ Giá trị tỷ lệ OD/C.O của xét nghiệm lặp lại có $0,9 < \text{tỷ lệ} < 1$: nên xét nghiệm lại cho bệnh nhân bằng phương pháp khác hoặc yêu cầu lấy lại bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

290. HCV Ag/Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện cả kháng thể Anti-HCV và kháng nguyên lõi HCV Ag của virus viêm gan C (HCV) trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HCV Ag/Ab bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính HCV Ag/Ab
1	Chuẩn bị số giếng cần dùng, sơ đồ nhỏ mẫu, chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2	Nhỏ dung dịch cộng hợp 1 vào mỗi giếng (tùy từng loại sinh phẩm).
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Chuẩn bị dung dịch rửa. Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp 2 vào các giếng
7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (18°C – 30°C) hoặc trong tủ ấm 37°C tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm hoặc bước sóng khác theo khuyến cáo của nhà sản xuất bằng máy đo mật độ quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
 - + NC: Độ hấp phụ của chứng âm.
 - + PC Ab: Độ hấp phụ của chứng dương Ab
 - + PC Ag: Độ hấp phụ của chứng dương Ag
 - + PCx: Giá trị OD trung bình của chứng dương Ab (PC Ab)
 - + C.O: Giá trị ngưỡng thường được tính toán dựa trên giá trị trung bình của chứng dương. Công thức tính tùy thuộc từng nhà sản xuất sinh phẩm. VD sinh phẩm MONOLISA HCV Ag/Ab ULTRA Bio-Rad :
 - + $NC < 0,6 \times CO$
 - + $0.800 \leq PC Ab \leq 2.700$
 - + $PC Ag > 0,500$

Loại chứng dương PC Ab có giá trị cao hơn 30% so với giá trị PCx. Tiếp tục tính kết quả theo 2 chứng dương còn lại.

- + VD cách tính PC_x nếu có 3 giếng PC: $PC_x = PC \text{ Ab OD} / 3$ (theo hướng dẫn của nhà sản xuất)
- + Loại chứng dương PC Ab < 1.0 hoặc PC Ab > 2.7 hoặc PC > 30% PC_x . Chỉ được loại 1 chứng âm và tiếp tục tính kết quả theo 2 chứng âm còn lại (theo yêu cầu của từng nhà sản xuất sinh phẩm cụ thể).
- + Tính CO: $CO = PC_x / 5$

Đọc kết quả và biện luận

- + Sự có mặt hay không có mặt của kháng nguyên Anti-HCV và hoặc kháng nguyên Ag được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang (OD) của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng (C.O), tính tỷ lệ OD/C.O.
- + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ OD/C.O < 1 được coi là âm tính với Anti-HCV và/hoặc HCV Ag
- + Mẫu huyết thanh có giá trị tỷ lệ OD/C.O ≥ 1 được làm lại. Nếu lần xét nghiệm thứ 2 giá trị tỷ lệ ≥ 1 . Mẫu huyết thanh coi là dương tính với Anti-HCV và/hoặc HCV Ag.
- + Mẫu huyết thanh có $0,9 < \text{tỷ lệ} < 1$. xét nghiệm lại 2 lần:
 - ✓ Giá trị tỷ lệ OD/C.O của xét nghiệm lặp lại ≥ 1 : mẫu được coi là dương tính với Anti-HCV và/hoặc HCV Ag.
 - ✓ Giá trị tỷ lệ OD/C.O của xét nghiệm lặp lại có $0,9 < \text{tỷ lệ} < 1$: nên xét nghiệm lại cho bệnh nhân bằng phương pháp khác hoặc yêu cầu lấy lại bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

291. HCV Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể Anti-HCV của virus viêm gan C (HCV) trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA (miễn dịch hóa phát quang, điện hóa phát quang hoặc miễn dịch huỳnh quang liên kết enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HCV bằng kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng PXN

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-HCV
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng, chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là Anti-HCV
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
 - + Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.
- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- + Chứng nội kiểm, ngoại kiểm(nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm.
- Kết quả và báo cáo
 - + Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên giá trị hiệu chuẩn của lô thuốc thử. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là có phản ứng hoặc không có phản ứng cùng với chỉ số ngưỡng (COI) của mẫu.

Kết quả được diễn giải như sau:

- + Nếu $COI < 0.90$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với anti-HCV.
- + Nếu $0.90 \leq COI \leq 1.0$: mẫu bệnh phẩm này nằm trong giới hạn nghi ngờ, cần phải kiểm tra lại.
- + Nếu $COI > 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với anti-HCV.
- + Đối với những mẫu được kiểm tra lại lần 2:
 - ✓ Nếu $COI < 0.90$ thì kết luận âm tính.
 - ✓ Nếu $COI \geq 0.90$ giống như lần đầu thì kết luận dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất
- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

292. HCV Ag/Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng nguyên lõi của vi rút viêm gan C (HCV Ag) và kháng thể kháng HCV (HCV Ab) trong huyết thanh và huyết tương người. Có thể sử dụng xét nghiệm này, cùng với các kết quả xét nghiệm và thông tin lâm sàng khác để hỗ trợ chẩn đoán và sàng lọc nhiễm HCV bằng kỹ thuật ECLIA (miễn dịch điện hóa phát quang).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ECLIA (miễn dịch điện hóa phát quang). Dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KN hoặc KT hoặc KKT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

Định nghĩa:

- HCV: Hepatitis C virus -Vi rus viêm gan C
- HCVAg: Hepatitis C virus Antigen-Kháng nguyên virus viêm gan C
- HCV Ab: Antibody Hepatitis C virus- Kháng thể virus viêm gan C
- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HCV Ag/Ab (VD hoặc tương đương)
- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Controls
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Dàn máy miễn dịch tự động
- Bộ lưu điện
- Hệ thống lọc nước khử ion
- Máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Máy ly tâm thường
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm HCV Ag/Ab (VD hoặc tương đương)

Các bước	Xét nghiệm định lượng HCV Ag/Ab
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Kiểm tra tình trạng hiệu chuẩn của máy. Hiệu chuẩn máy khi có yêu cầu.
3	Chạy chứng Precicontrol HCV Ag/Ab bao gồm 2 mức: PC HCV Ag/Ab 1 và PC HCV Ag/Ab 2 Đánh giá kết quả QC đạt, tiến hành chạy mẫu bệnh phẩm
4	Chạy mẫu theo các bước sau:
5	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước sau	
6	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
7	Vào màn hình Workplace → Test Selection
8	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
9	Chọn tên test là HCV Ag/Ab
10	Vào Barcode Read Error
11	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
12	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.

13	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Nếu chạy mẫu có barcode thì bỏ các bước từ 6-11 và tiến hành như sau:	
14	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm của PXN
	Tiếp tục quay lại bước 12 và 13, bước 12 đặt trực tiếp ống máu vào rack màu xám, quay đầu có barcode ra ngoài, không cần order.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Máy xét nghiệm tự động tính toán dựa trên các đường chuẩn. Tham khảo hướng dẫn sử dụng thiết bị để biết thông tin chi tiết.

Kết quả nên được diễn giải như sau:

- $COI < 1.0$: Xét nghiệm kháng nguyên âm tính, xét nghiệm kháng thể âm tính
- $COI \geq 1$: Xét nghiệm kháng nguyên dương tính, xét nghiệm kháng thể dương tính hoặc xét nghiệm kháng nguyên dương tính, xét nghiệm kháng thể âm tính hoặc xét nghiệm kháng nguyên âm tính, xét nghiệm kháng thể dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Mẫu bệnh phẩm có chứa các chất gây nhiễu vượt quá nồng độ theo khuyến cáo của nhà sản xuất như: mẫu có nồng độ bilirubin, biotin, các dược phẩm.
- Sử dụng hóa chất quá hạn sử dụng.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng...

Thực hiện xét nghiệm lại trong các trường hợp có sai sót.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

293. HCV Core Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và định lượng kháng nguyên lõi HCV core Ag của virus viêm gan C (HCV) trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CMIA (phản ứng hóa phát quang được tính bằng đơn vị ánh sáng tương đương RLU) với quy trình xét nghiệm linh hoạt Chemiflex.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HCV core Ag bằng kỹ thuật CLIA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Pre-trigger solution
- Trigger solution
- Wash Buffer
- Reaction Vessel
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Sample Cup
- Septum
- Replacement Cap
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo

- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Micropipette vi lượng 100, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng PXN

Các bước	Xét nghiệm xác định HCV Core Ag
1	Máy ở chế độ READY Nạp bộ thuốc thử HCV Ag vào hệ thống (lắc chai Vi hạt để phân tán các vi hạt có thể bị lắng trong quá trình vận chuyển). • Lắc đảo ngược chai vi hạt để được phân tán hoàn toàn. • Đặt septum lên chai. Nạp thuốc thử vào khay, chai thuốc thử đã mở nắp đều có septum đầy lại
2	Vào màn hình chính, chọn Reagent → Reagent Status kiểm tra số lượng tests. Kiểm tra Cal Status của hộp thuốc thử ở chế độ Active.
3	Vào Supply → Supply Status kiểm tra các vật tư tiêu hao và dung dịch chạy máy.
4	Chuyển máy sang chế độ RUNNING
5	Tiến hành chạy mẫu chứng (control). Tham khảo quy trình chạy mẫu chứng
6	Chạy mẫu bệnh phẩm theo các bước sau: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Cho trực tiếp ống máu vào Sample Carrier
2	Vào màn hình Order → Patient Order
3	Nhập mã Carrier, mã bệnh phẩm
4	Chọn Test HCV Ag
5	Chọn Add Order
6	Đưa Carrier vào bộ phận nạp mẫu trên máy
Chạy mẫu dùng barcode	
1	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính (hệ thống LIS)
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào Carrier, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào bộ phận nạp mẫu

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

Nhận định kết quả xét nghiệm Anti-HCV bằng bộ sinh phẩm HCV Ag/Ab

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
 - + Chạy mẫu chứng mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn.
 - + Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và có thể có sự thay đổi về giới hạn chứng. Vì vậy khi nhận một lô control mới, cần kiểm tra “Bảng giá trị” của nhà sản xuất xem có phải thay đổi lại giá trị chứng hay không. Nếu cần thì phải nhập lại số liệu bằng tay để cập nhật giá trị chứng mới.
- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - + Chứng nội kiểm, ngoại kiểm(nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm.
- Kết quả và báo cáo
- Xét nghiệm HCV Ag sử dụng phương pháp rút giảm số liệu cho phù hợp với đường cong Logistic 4 Thông số (gọi tắt là 4PLC, theo trục Y) để vẽ đường cong hiệu chuẩn.
 - + Mẫu có nồng độ < 3.00 fmol/L được xem là không phản ứng với HCV Ag.
 - + Mẫu có nồng độ ≥ 3.00 fmol/L được xem là có phản ứng với HCV Ag.
 - + Mẫu có nồng độ ≥ 3.00 fmol/L và < 10.00 fmol/L nên được làm lại 2 lần.
 - + Nếu cả hai lần chạy lại xét nghiệm đều cho kết quả không phản ứng, mẫu được xem là không phản ứng với HCV Ag.
 - + Nếu một trong hai kết quả xét nghiệm chạy lại ≥ 3.00 fmol/L, mẫu được xem là phản ứng lặp lại với HCV Ag, là kết quả định lượng ban đầu được sử dụng làm kết quả báo cáo cuối cùng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất
- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.

294. HCV PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của Hepatitis C virus (HCV) trong mẫu bệnh phẩm máu của bệnh nhân nhiễm HCV bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của HCV được sao chép ngược bằng RT-PCR và khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, sự có mặt của HCV được xác định dựa vào kích thước của sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng so với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- HCV: Hepatitis C Virus
- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C

- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh, dịch cơ thể nghi nhiễm HCV.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HCV chuẩn hoặc mẫu HCV dương tính đã được xác định. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết

ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

- *Thành phần phản ứng RT-PCR (vòng 1):*

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	Mồi xuôi	1.0
3	Mồi ngược	1.0
4	H ₂ O	12.0
5	ARN khuôn	10.0
6	Tổng thể tích	50

- *Thành phần phản ứng Nested PCR (vòng 2):*

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂	1
3	Mồi xuôi	1
4	Mồi ngược	1
5	H ₂ O	20
6	ADN khuôn (PCR vòng 1)	2
7	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

PCR vòng 1:

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết ARN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ARN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	55 °C	30 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
3	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	55 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
4	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
5	4 °C	Bảo quản	

PCR vòng 2:

- Chuyển 2 µl sản phẩm PCR vòng 1 cùng các chứng âm, chứng dương vào các ống PCR chứa Master mix vòng 2 tương ứng
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm PCR vòng 1.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm: Nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách, phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy
- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có sản phẩm PCR, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có sản phẩm PCR, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có sản phẩm PCR, mẫu chứng âm không có sản phẩm, kết quả đó sẽ được sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

295. EBV PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của Epstein-Barr Virus (EBV) trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân nhiễm EBV bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của EBV được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, sự có mặt của EBV được xác định dựa vào kích thước của sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng so với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa:

- EBV: Epstein-Barr Virus
- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 μ l – 1000 μ l

- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh, dịch cơ thể, mẫu sinh thiết (kích thước tối thiểu 1 x 1 x 1 mm)
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu EBV chuẩn hoặc mẫu EBV dương tính đã được xác định. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	57 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %.
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μl sản phẩm PCR + 1.5 μl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel.
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút.
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm: Nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách, phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy
- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có sản phẩm PCR, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có sản phẩm PCR, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có sản phẩm PCR, mẫu chứng âm không có sản phẩm, kết quả đó sẽ được sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

296. Rotavirus PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của Rotavirus trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân nhiễm Rotavirus bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của Rotavirus được sao chép ngược bằng phản ứng RT-PCR và khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, sự có mặt của Rotavirus được xác định dựa vào kích thước của sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng so với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa:

- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy đọc gel
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C

- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm là phân được thu thập trong ống đựng kín, không cần chất bảo quản
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu Rotavirus dương tính đã được xác định. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết

ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:
- *Thành phần phản ứng RT-PCR (vòng 1):*

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	Môi xuôi	1.0
3	Môi ngược	1.0
4	H ₂ O	12.0
5	ARN khuôn	10.0
6	Tổng thể tích	50

- *Thành phần phản ứng Nested PCR (vòng 2):*

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂	1
3	Môi xuôi	1
4	Môi ngược	1
5	H ₂ O	20
6	ADN khuôn (PCR vòng 1)	2
7	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

PCR vòng 1:

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết ARN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ARN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	505°C	30 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
3	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	56 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
4	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
5	4 °C	Bảo quản	

PCR vòng 2:

- Chuyển 2 µl sản phẩm PCR vòng 1 cùng các chứng âm, chứng dương vào các ống PCR chứa Master mix vòng 2 tương ứng
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm PCR vòng 1.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả**4.2.1. Xem xét kết quả các chứng**

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm: Nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách, phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy
- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có sản phẩm PCR, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có sản phẩm PCR, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có sản phẩm PCR, mẫu chứng âm không có sản phẩm, kết quả đó sẽ được sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

297. HCV đo tải lượng Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định số lượng bản sao của virus viêm gan C (HCV) trong một đơn vị thể tích huyết thanh hoặc huyết tương (IU/ml) bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR, là phản ứng PCR trong đó phân tử RNA được phiên mã ngược tạo cDNA và kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Các mẫu chuẩn được chạy cùng với mẫu bệnh phẩm và khi cường độ tín hiệu huỳnh quang của mẫu vượt qua đường tín hiệu huỳnh quang nền của phản ứng thì mẫu được xem là dương tính và ta lấy thời điểm vượt qua đó (biểu hiện qua giá trị chu kỳ ngưỡng – Ct) để so sánh với đường cong chuẩn (chứng chuẩn) được xây dựng từ chu kỳ ngưỡng của các mẫu chuẩn đã biết trước nồng độ từ đó suy ra số lượng DNA mẫu đưa vào phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml

- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (μl)	25	50	100	200
Thể tích IS (μl)	2,5	5	10	20

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng}$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng chuẩn (standard) gồm 4 nồng độ để làm căn cứ tính nồng độ HCV trong mẫu và đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết RNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Hút 30 μ l Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

** Realtime-PCR*

Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Đánh số dãy ống PCR 0,2 ml theo số thứ tự mẫu bệnh phẩm.
- Thêm 10 μ l của mẫu axit nucleic của mẫu bệnh nhân hoặc Calibrator/ Control vào các ống PCR riêng lẻ. Thể tích cuối cùng của phản ứng sẽ là 40 μ l.
- Đóng các ống, ly tâm nhanh (spindown), đặt vào máy Real-time PCR theo sơ đồ vị trí mẫu.
- Chọn màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện HBV, màu HEX cho phát hiện chứng nội.
- Chọn chương trình luân nhiệt đã được cài đặt trên máy như sau:
 - + 1 chu kỳ: 42⁰C/5 phút
 - + 1 chu kỳ: 95⁰C/10 giây
 - + 50 chu kỳ: 95⁰C/5 giây
 - 58⁰C/40 giây – đọc sản phẩm
 - 72⁰C/10 giây
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính hoặc âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính

4.2.2. Đọc kết quả

- Phân tích standard:
 - Hệ số tuyến tính (R2) phải nằm trong khoảng 0.960-1.000, tốt nhất 0.990-1.000.
 - Hiệu suất nhân bản (PCR efficiency) phải nằm trong khoảng 90-115%, tốt nhất 95-110%.
 - Hệ số dốc (Slope) phải nằm trong khoảng -3 đến -4, tốt nhất -3.3 đến -3.6.
- Phân tích mẫu:

- Ngưỡng phát hiện của bộ kit là 208.54 IU/ml;
- Dải đo từ 208.54 IU/ml - 1010 IU/ml.

Những mẫu dương tính chỉ cần chọn màu FAM để phân tích. Với những mẫu dương tính, sử dụng công thức sau để tính nồng độ virus trong mẫu:

$$\text{IU/ml} = (\text{SC} \times \text{EV})/\text{IV}$$

Trong đó: SC (Sample Concentration) = Nồng độ virus trong mẫu (IU/μl)

EV (Elution Volume) = Thể tích mẫu thu sau tách chiết (μl)

IV (Isolation Volume) = Thể tích mẫu dùng để tách chiết (ml)

- Chứng nội chuẩn (IS) được thêm vào mẫu bệnh phẩm trước khi tách chiết để kiểm soát quá trình tách RNA và chạy Real-time PCR. Những mẫu có chứng nội chuẩn không đạt cần phải được kiểm tra lại từ bước tách chiết.

Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

- Nguyên nhân: Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.
- Khắc phục:
 - Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.
 - Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

298. HCV đo tải lượng hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và định lượng HCV RNA trong huyết tương người trên hệ thống máy PCR tự động xử lý mẫu, khuếch đại và phát hiện.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR, là phản ứng PCR trong đó phân tử RNA được phiên mã ngược tạo cDNA và kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. HCV master mix chứa đoạn dò kép phát hiện đặc hiệu cho các trình tự đích HCV và chứng nội chuẩn RNA-QS (Ribonucleic acid - Quantitation Standard). Các đoạn dò được đánh dấu với các chất phát huỳnh quang đặc hiệu với đích, cho phép phát hiện đồng thời HCV mục tiêu và RNA-QS trong hai kênh đích khác nhau. Với mỗi chu kỳ PCR, số lượng của đoạn dò đã phân tách được tạo ra càng tăng và tín hiệu tích lũy của chất phát huỳnh quang đồng thời tăng. Việc phát hiện và phân biệt real-time các sản phẩm PCR được thực hiện bằng cách đo huỳnh quang của các chất phát huỳnh quang được giải phóng ra tương ứng với HCV và RNA-QS.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm /Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương từ máu chống đông bằng EDTA.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 180 phút (3 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

1	Đăng nhập hệ thống
2	Nạp mẫu lên hệ thống • Nạp giá mẫu thử lên hệ thống • Hệ thống tự động chuẩn bị • Tạo lệnh xét nghiệm
3	Thêm thuốc thử và vật tư tiêu hao theo yêu cầu của hệ thống • Nạp đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm • Nạp giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) • Nạp các đầu tip xử lý • Nạp các đầu tip rửa giải • Nạp các đĩa xử lý • Nạp các đĩa chất thải lỏng • Nạp các đĩa khuếch đại • Nạp hộp cassette MGP • Thêm chất pha loãng mẫu • Thêm thuốc thử ly giải • Thêm đệm rửa
4	Bắt đầu chạy xét nghiệm bằng cách chọn nút Start processing trên giao diện người sử dụng, tất cả các mẻ chạy sau đó sẽ được tự động bắt đầu nếu không bị hoãn thủ công bởi người sử dụng.
5	Kiểm tra và xuất kết quả
6	Lấy ra và đẩy nắp bất kỳ ống mẫu nào đáp ứng yêu cầu thể tích tối thiểu để sử dụng thêm nếu cần Vệ sinh thiết bị • Lấy giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) đã hết ra khỏi máy • Lấy đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm đã hết ra khỏi máy • Dọn khay đựng các đĩa khuếch đại • Đổ bỏ chất thải lỏng • Đổ bỏ chất thải rắn

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

a. Đánh giá theo yêu cầu của nhà sản xuất

- Hệ thống tự động xác định nồng độ HCV-RNA cho mẫu thử và mẫu chứng với đơn vị là IU/ml.
- Mẻ xét nghiệm hợp lệ nếu không xuất hiện cờ hiệu cho tất cả ba mẫu chứng âm, chứng dương thấp và chứng dương cao.
- Kết quả mẫu chứng âm tính được hiển thị là (-) C.
- Kết quả mẫu chứng dương tính nồng độ thấp và cao được hiển thị là HxV L (+) C và HxV H (+) C.

- Kết quả được tự động gán là không hợp lệ bởi phần mềm khi kết quả của mẫu chứng âm tính hoặc dương tính không đạt.

b. Đánh giá theo yêu cầu phòng xét nghiệm

Đánh giá QC (NC, LPC, HPC) theo hướng dẫn theo dõi QC của phòng xét nghiệm.

4.2.2. Đọc kết quả:

a. Đọc kết quả của mẫu chứng trong ứng dụng “Controls”.

- Valid: nếu tất cả kết quả được báo cáo hợp lệ
- Invalid: nếu tất cả kết quả được báo cáo là không hợp lệ
 - + Mẫu chứng được hiển thị ‘Invalid’ sẽ xuất hiện cờ hiệu ở cột “Flags”. Thông tin thêm về lý do mẫu chứng được báo cáo là không hợp lệ, bao gồm cả thông tin cờ hiệu được hiển thị trong chế độ xem thông tin chi tiết.
 - + Nếu một trong các mẫu chứng dương tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các mẫu chứng dương tính và mẫu thử có liên quan.
 - + Nếu mẫu chứng âm tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các chứng và mẫu thử có liên quan.

b. Đọc kết quả của mẫu bệnh phẩm

Một mẻ xét nghiệm hợp lệ có thể bao gồm kết quả mẫu hợp lệ và không hợp lệ.

Kết quả	Biện luận
Không phát hiện đích	Không phát hiện RNA HCV. Báo cáo kết quả là “Không phát hiện HCV”.
< Nồng độ tối thiểu	Nồng độ tính nằm dưới Giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của xét nghiệm. Báo cáo kết quả là “Phát hiện HCV, thấp hơn (Nồng độ tối thiểu)” Nồng độ tối thiểu = 15 IU/mL (500 µL) Nồng độ tối thiểu = 40 IU/mL (200 µL)
Nồng độ	Nồng độ tính nằm trong Khoảng tuyến tính của xét nghiệm - lớn hơn hoặc bằng Nồng độ tối thiểu và nhỏ hơn hoặc bằng Nồng độ tối đa. Báo cáo kết quả là “Phát hiện (Nồng độ) HCV”.
> Nồng độ tối đa ^a	Nồng độ tính nằm trên Giới hạn định lượng trên (ULOQ) của xét nghiệm. Báo cáo kết quả là “Phát hiện HCV, cao hơn (Nồng độ tối đa).” Nồng độ tối đa = 1.00E+08 IU/mL (500 µL và 200 µL)

^a Kết quả mẫu > Nồng độ tối đa là do những mẫu dương tính với HCV được phát hiện với nồng độ nằm trên giới hạn định lượng trên (ULOQ). Nếu muốn thu được kết quả định lượng, phải pha loãng mẫu ban đầu với huyết tương chống đông bằng EDTA hoặc huyết thanh âm tính với HCV, tùy thuộc vào loại mẫu ban đầu, và xét nghiệm nên được thực hiện lại. Nhân kết quả xét nghiệm thu được với hệ số pha loãng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kết quả đo tải lượng HCV bị ảnh hưởng khi nồng độ hemoglobin trong mẫu $\geq 250\text{mg/dL}$.
- Kết quả có thể âm tính giả trong các trường hợp sau:
 - + Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng: heparin
 - + Môi trường:
 - Sử dụng quá nhiều a-xít hypochlorous trong khử nhiễm phòng thí nghiệm.
 - Sử dụng găng có bột talc khi thực hiện xét nghiệm.
- Kết quả có thể dương tính giả trong các trường hợp sau:
 - + Có sự lây nhiễm chéo giữa các mẫu bệnh phẩm.
 - + Lây nhiễm các sản phẩm khuyếch đại từ lần phản ứng trước.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

299. HAV Ab test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện, định tính và phân biệt nhanh kháng thể IgG và IgM kháng virus viêm gan A trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với chất cộng hợp có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa: HAV (Hepatitis A virus): Virus viêm gan A.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Để tất cả các thành phần của Kit thử và mẫu về nhiệt độ 15~30°C trước khi tiến hành xét nghiệm
- Lấy thanh xét nghiệm ra khỏi túi đựng và đặt lên mặt khô, phẳng
- Dùng pipet mao dẫn 5µl, lấy 5µl huyết thanh hoặc huyết tương tới vạch đen và nhỏ vào giếng vuông chữ “S”

Hoặc

- Sử dụng micropipet nhỏ 5µl huyết thanh hoặc huyết tương vào giếng mẫu hình vuông chữ “S”.
- Nhỏ 4 giọt dung môi pha mẫu vào giếng hình tròn.
- Đọc kết quả trong vòng 20 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính; Chỉ nhìn thấy Vạch chứng (C) trên thanh xét nghiệm. Không phát hiện có kháng thể IgG và IgM.
- IgM dương tính: Xuất hiện vạch chứng (C) và vạch IgM (M) trên thanh thử, tức là dương tính đối với kháng thể IgM kháng virus HAV
- IgG dương tính: Xuất hiện vạch chứng (C) và vạch IgG (G) trên thanh thử, tức là dương tính đối với kháng thể IgG kháng virus HAV
- IgG và IgM dương tính: Xuất hiện vạch chứng (C), vạch IgM (M) và vạch IgG (G) trên thanh thử, tức là dương tính đối với cả 2 kháng thể IgM và IgG kháng virus HAV.
- Kết quả không có giá trị nếu vạch chứng (C) không xuất hiện.
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

300. HAV IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể Anti-HAV IgM trong huyết thanh và huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HAV IgM bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh nti-
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-HAV IgM
1	Chuẩn bị số giếng cần dùng, sơ đồ nhỏ mẫu, chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2	Pha loãng bệnh phẩm trong dung dịch pha loãng bệnh phẩm theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhỏ dung dịch loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng (tùy từng loại sinh phẩm).
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (18°C – 30°C) tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
 - + Blank: Độ hấp phụ của giếng trắng
 - + Cal: Độ hấp phụ của dung dịch chuẩn Cal
 - + NC: Độ hấp phụ của chứng âm.
 - + PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
 - + C.O: Giá trị ngưỡng thường được tính toán dựa trên giá trị trung bình của chứng âm, hoặc chứng dương, hoặc Cal. Công thức tính tùy thuộc từng nhà sản xuất sinh phẩm.

VD sinh phẩm ETI – HA – IGMK PLUS DiaSorin (VD)

- + Giếng trắng (Blank): $0.000 \leq \text{BLK} \leq 0.150$
- + Giá trị trung bình của Cal: $-0.020 < \text{Cal} \leq 0.120$
- + Giá trị của Cal: $-0.020 < \text{Cal} < 0.120$
- + Giá trị chứng âm (NC): $-0.020 < \text{NC} < 0.120$
- + Giá trị chứng dương (PC): $0.5 < \text{PC} < 2.5$

- + $PC - NC > 0.380$
- + $CO = Cal \times \bar{0.100}$ (Cal x: giá trị trung bình của Cal)
- Đọc kết quả và biện luận
 - + Sự có mặt hay không có mặt của kháng thể anti-HAV IgM được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang (OD) của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng (C.O), tính tỷ lệ OD/C.O.
 - + Mẫu có tỷ lệ OD/CO < 0,8 được coi là âm tính với Anti-HAV IgM.
 - + Mẫu có tỷ lệ OD/CO > 1.2 được coi là dương tính với Anti-HAV IgM.
 - + Mẫu có tỷ lệ OD/CO nằm trong khoảng từ 0.8 đến 1.2 cần phải được kiểm tra lại lần 2.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Nhân viên phải được đánh giá năng lực hàng năm đạt mới được thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

301. HAV total miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể Anti-HAV toàn phần kháng virus viêm gan A (HAV) trong huyết thanh và huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HAV total bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh nti-
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính HAV Ab
1	Chuẩn bị số giếng cần dùng, sơ đồ nhỏ mẫu, chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2	Pha loãng bệnh phẩm trong dung dịch pha loãng bệnh phẩm theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhỏ dung dịch loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng (tùy từng loại sinh phẩm).
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất
4	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm khô bằng giấy thấm
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng ($18^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
 - + Blank: Độ hấp phụ của giếng trắng
 - + Cal: Độ hấp phụ của dung dịch chuẩn Cal
 - + NC: Độ hấp phụ của chứng âm.
 - + PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
 - + C.O: Giá trị ngưỡng thường được tính toán dựa trên giá trị trung bình của chứng âm, hoặc chứng dương, hoặc Cal. Công thức tính tùy thuộc từng nhà sản xuất sinh phẩm.

VD sinh phẩm ETI – HA – IGMK PLUS DiaSorin (VD)

- + Giếng trắng (Blank): $0.000 \leq \text{BLK} \leq 0.150$
- + Giá trị trung bình của Cal: $\text{PC} < \text{Cal} \times 0.6 \text{ NC}$
- + Giá trị của Cal: $\text{PC} < \text{Cal} < 0.6 \text{ NC}$
- + Giá trị chứng âm (NC): $0.5 < \text{NC} < 2.5$
- + Giá trị chứng dương (PC): $0.000 \leq \text{PC} \leq 0.250$

- + $NC - PC > 0.250$
- + $CO = Cal \times (\bar{Cal} \text{ x: giá trị trung bình của Cal})$
- Đọc kết quả và biện luận
 - + Sự có mặt hay không có mặt của kháng thể Anti-HAV total được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang (OD) của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng (C.O), tính tỷ lệ OD/C.O.
 - + Mẫu có tỷ lệ OD/CO < 0,8 được coi là dương tính với Anti-HAV total.
 - + Mẫu có tỷ lệ OD/CO > 1.2 được coi là âm tính với Anti-HAV total.
 - + Mẫu có tỷ lệ OD/CO nằm trong khoảng từ 0.8 đến 1.2 cần phải được kiểm tra lại lần 2.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.
- Xử trí:
- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Nhân viên phải được đánh giá năng lực hàng năm đạt mới được thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

302. HAV IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể HAV lớp IgM kháng virus viêm gan A trong huyết thanh, huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA (miễn dịch hóa phát quang, điện hóa phát quang hoặc miễn dịch huỳnh quang liên kết enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HAV IgM bằng kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng loại sinh phẩm sử dụng của PXN

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-HAV IgM
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng, chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là Anti-HAV IgM
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

Nhận định kết quả xét nghiệm Anti-HAV IgM bằng bộ sinh phẩm Anti-HAV IgM

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
 - + Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - + Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm.
- Kết quả và báo cáo
 - + Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên giá trị hiệu chuẩn của lô thuốc thử. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là có phản ứng hoặc không có phản ứng cùng với chỉ số ngưỡng (COI) của mẫu.

Kết quả được diễn giải như sau:

- + Những mẫu xét nghiệm có $COI < 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với Anti-HAV IgM.
- + Những mẫu xét nghiệm có $COI \geq 1.0$ mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với Anti-HAV IgM.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)

Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất

Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

303. HAV total miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể HAV toàn phần kháng virus viêm gan A (HAV) trong huyết thanh, huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA (miễn dịch hóa phát quang, điện hóa phát quang hoặc miễn dịch huỳnh quang liên kết enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HAV total bằng kỹ thuật CLIA, ECLIA, ELFA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng loại sinh phẩm sử dụng của PXN

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-HAV total
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng PC HAV1 và PC HAV2
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng, chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là Anti-HAV II
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ y tế.

Nhận định kết quả xét nghiệm Anti-HAV II bằng bộ sinh phẩm Anti-HAV II

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra QC (PC Anti-HAV1 và PC Anti-HAV2) mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn. Phải chạy chứng trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.

- + Giá trị QC đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn đã được xác định của nhà sản xuất. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và trong mỗi lô hóa chất Anti-HAV II khác nhau có thể tự cập nhật vào phần mềm máy hoặc phải nhập thủ công vào bảng giá trị trên phần mềm. Phải kiểm tra “Bảng giá trị” của nhà sản xuất để cập nhật giá trị chứng bằng tay (nếu có) trước khi đánh giá QC.
- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - + Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm.
- Kết quả và báo cáo
 - + Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên giá trị hiệu chuẩn của lô thuốc thử. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là có phản ứng hoặc không có phản ứng cùng với chỉ số ngưỡng (COI) của mẫu.
 - Kết quả được diễn giải như sau:
 - + Những mẫu xét nghiệm có $COI > 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với kháng thể đặc hiệu HAV.
 - + Những mẫu xét nghiệm có $COI \leq 1.0$ mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với kháng thể đặc hiệu HAV.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất

- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

304. HDV Ag miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên HDV Ag của vi rút viêm gan D (HDV) trong huyết thanh (huyết tương) người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HDV Ag bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính HDV Ag
2.1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.5	Nhỏ dung dịch Nonidet P-40
2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân
2.7	Đậy tấm và ủ ở 37°C trong 45 phút
2.8	Chuẩn bị cộng hợp
2.9	Rửa phiến nhựa
2.10	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.11	Đậy tấm và ủ
2.12	Rửa phiến nhựa
2.13	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.14	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.15	Dừng phản ứng
2.16	Đọc kết quả ở bước sóng 450/630nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
- Tính giá trị ngưỡng
 $\text{Cut-off (C.O)} = \text{Giá trị trung bình chứng âm} + 0.100$
- Điều kiện của phản ứng
 - + OD của giếng trống ≤ 0.150 .
 - + OD của trung bình chứng âm < 0.100
 - + OD của mỗi chứng âm < 0.110
 - + Trung bình chứng dương – trung bình chứng âm ≥ 0.5
- Diễn giải kết quả
 - + Dương tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $\geq \text{C.O}$
 - + Nghi ngờ: nếu OD mẫu nhỏ hơn hoặc lớn hơn 10 % C.O
 - + Âm tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $< \text{C.O}$

- Nếu kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm lần 2.
- + Nếu kết quả OD lần 2 > C.O → kết luận dương tính
- + Nếu kết quả OD lần 2 < C.O → kết luận âm tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.
- Xử trí:
 - + Thực hiện đúng quy trình theo hướng dẫn nhà sản xuất
 - + Nhân viên thực hiện cần được đánh giá năng lực đạt mới được thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

305. HDV IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể lớp IgM kháng virus viêm gan D trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HDV IgM bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh nti-
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-HDV IgM
2.1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng bệnh phẩm
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân
2.7	Đậy tấm và ủ
2.8	Rửa
2.9	Nhỏ dung dịch kháng nguyên
2.10	Đậy tấm và ủ
2.11	Chuẩn bị cộng hợp
2.12	Rửa
2.13	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.14	Đậy tấm và ủ
2.15	Rửa
2.16	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.17	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.18	Dừng phản ứng
2.19	Đọc kết quả ở bước sóng 450/630nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
- Tính giá trị ngưỡng
 - Cut-off (C.O) = Giá trị trung bình chứng âm + 0.100
- Điều kiện của phản ứng
 - + OD của giếng trống ≤ 0.150 .
 - + OD của trung bình chứng âm < 0.100
 - + Trung bình chứng dương – trung bình chứng âm ≥ 0.300
- Diễn giải kết quả
 - + Dương tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $\geq C.O$

- + Nghi ngờ: nếu OD của mẫu nhỏ hơn hoặc lớn hơn 10 % C.O
- + Âm tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm < C.O
- Nếu kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm lần 2.
 - + Nếu kết quả dương tính lặp lại → kết luận dương tính
 - + Nếu kết quả lần 2 âm tính → kết luận âm tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Nhân viên phải được đánh giá năng lực hàng năm đạt mới được thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

306. HDV Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể kháng vi rút viêm gan D (HDV Ab) trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện HDV Ab bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính HDV Ab
2.1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Chuẩn bị cộng hợp
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân
2.7	Nhỏ chất cộng hợp
2.8	Đậy nắp và ủ
2.9	Rửa
2.10	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.11	Ủ, không đậy nắp và tránh ánh sáng
2.12	Dùng phản ứng
2.13	Đọc kết quả ở bước sóng 450/630nm trong vòng 60 phút sau khi dùng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

- Tính giá trị ngưỡng (cut-off CO)

$$CO = \text{Giá trị TB chứng âm} \times 0.5 + \text{Giá trị TB chứng dương} \times 0.5$$

- Điều kiện của phản ứng

+ OD của giếng trống ≤ 0.150 .

+ OD của trung bình chứng âm ≥ 0.600

+ OD của trung bình chứng dương ≤ 0.800

+ Trung bình chứng âm – trung bình chứng dương ≥ 0.500

- Diễn giải kết quả

+ Dương tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $\leq$ OD của cut-off

+ Nghi ngờ: nếu tỉ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 10 % OD của cut-off

+ Âm tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $\geq$ OD của cut-off

- Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm lần 2.

+ Nếu kết quả dương tính lặp lại $\rightarrow$ kết luận dương tính

+ Nếu kết quả lần 2 âm tính $\rightarrow$ kết luận âm tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

307. HEV Ab test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể kháng HEV trong huyết thanh hoặc huyết tương người và được sử dụng như một xét nghiệm hỗ trợ trong chẩn đoán và theo dõi tình trạng nhiễm virus viêm gan E bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng nguyên tái tổ hợp có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa: HEV IgM: kháng thể IgM kháng virus viêm gan E

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HEV IgM Rapid test (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 200ul
- Tube đựng bệnh phẩm vô trùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 4°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Pipet tự động hay bán tự động điều chỉnh được dùng phân phối các thể tích từ 2 µl đến 200 µl.
- Đồng hồ bấm giờ
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám bệnh chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm HEV IgM Rapid test (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Lấy số thanh thử cần sử dụng ra khỏi bao bảo quản
2	Ghi mã bệnh phẩm vào thanh thử
3	Nhỏ 25 µl bệnh phẩm vào giếng số 1
4	Đợi đến khi bệnh phẩm mao dẫn gần đến vạch màu xanh, nhỏ 03 giọt Chase Buffer vào giếng số 2
5	Kéo thanh có ghi HEV xuống và nhỏ 01 giọt Chase Buffer vào giếng số 1
6	Đợi 15 phút và đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch buffer bị nhiễm bẩn.
- Sử dụng thuốc thử quá hạn

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

308. HEV IgM test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể lớp IgM kháng virus viêm gan E trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

Định nghĩa:

- Anti-HEV IgM: Kháng thể lớp IgM của virus viêm gan E
- HEV: Hepatitis E virus-Vi rút viêm gan E

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HEV IgM bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Micropipette vi lượng 50 µl -100 µl.
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giây
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm phát hiện HEV IgM nhanh
1	Lấy số lượng thanh thử cần thiết. Ghi mã bệnh phẩm tương ứng
2	Nhỏ huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm theo hướng dẫn.
3	Nhỏ dung dịch đệm phản ứng vào giếng (2) theo hướng dẫn.
4	Nhỏ dung dịch đệm vào giếng (3) theo hướng dẫn.
5	Chờ 15 phút đọc kết quả.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Xuất hiện 2 vạch đỏ ở phần chứng và phần bệnh phẩm.
- Âm tính: Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần chứng.
- Không xác định:
 - + Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần bệnh phẩm.
 - + Không có vạch đỏ nào xuất hiện ở phần chứng và phần bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng. Những mẫu bệnh phẩm tan huyết sẽ ảnh hưởng đến chất lượng và kết quả xét nghiệm

Xử trí: Từ chối mẫu khi chất lượng mẫu không đạt

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Thời gian đọc KQ → ghi lại thời gian làm xét nghiệm và thời gian đọc kết quả để tránh dương tính giả và âm tính giả.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Nhân viên phải được đánh giá năng lực hàng năm đạt mới được thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

309. HEV IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể lớp IgM kháng virus viêm gan E trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HEV IgM bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh nti-
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính HEV IgM
2.1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng bệnh phẩm
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ dung dịch trung hòa vào những giếng nhỏ bệnh phẩm
2.7	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
2.8	Đậy tấm và ủ
2.9	Rửa
2.10	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.11	Đậy tấm và ủ
2.12	Rửa
2.13	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.14	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.15	Dừng phản ứng
2.16	Đọc kết quả ở bước sóng 450/630nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
- Tính giá trị ngưỡng

$$\text{Cut-off (CO)} = \text{Giá trị trung bình chứng âm} + 0.25$$

- Điều kiện của phản ứng
 - + OD của giếng trống $\leq 0,100$
 - + OD của chứng âm $< 0,100$
 - + OD của chứng dương $> 0,500$

- Diễn giải kết quả

Tính tỷ lệ OD của bệnh phẩm/C.O (R)

- + Dương tính: $R > 1,2$
- + Nghi ngờ: $1 < R \leq 1,2 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm lần 2 sau 1 – 2 tuần
- + Âm tính: $R < 1$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Nhân viên phải được đánh giá năng lực hàng năm đạt mới được thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

310. HEV IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể lớp IgG kháng virus viêm gan E trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Anti-HEV IgG bằng kỹ thuật ELISA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh nti-
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo
- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)

- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm định tính HEV IgG
2.1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng bệnh phẩm
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ dung dịch trung hòa vào những giếng nhỏ bệnh phẩm
2.7	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
2.8	Đậy tấm và ủ
2.9	Rửa
2.10	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.11	Đậy tấm và ủ
2.12	Rửa
2.13	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.14	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.15	Dừng phản ứng
2.16	Đọc kết quả ở bước sóng 450/630nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

- Điều kiện (theo yêu cầu của nhà sản xuất)
- Tính giá trị ngưỡng

$$\text{Cut-off (C.O)} = \text{Giá trị trung bình chứng âm} + 0.35$$

- Điều kiện của phản ứng
 - + OD của giếng trống $\leq 0,100$
 - + OD của chứng âm $< 0,05$ sau khi trừ OD của giếng trống
 - + OD của chứng dương > 1.0
 - + CAL: $\text{OD cal} / \text{C.O} > 1.1$
- Diễn giải kết quả

Tính tỷ lệ OD của bệnh phẩm/C.O (R)

- + Dương tính: $R > 1,1$
- + Nghi ngờ: $0.9 \leq R \leq 1,1 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm mẫu thứ 2 sau 1-2 tuần

+ Âm tính: $R < 0,9$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kỹ thuật nhỏ mẫu, kỹ thuật thấm khô không thành thạo cũng có thể dẫn tới kết quả không chính xác
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.
- Xử trí:
- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Nhân viên phải được đánh giá năng lực hàng năm đạt mới được thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

311. HEV IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể HEV IgM trong huyết thanh hoặc huyết tương người. Xét nghiệm này được sử dụng để hỗ trợ chẩn đoán nhiễm viêm gan E ở bệnh nhân có các triệu chứng và/hoặc dấu hiệu lâm sàng của viêm gan bằng kỹ thuật enzyme liên kết huỳnh quang (ELFA).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật enzyme liên kết huỳnh quang (ELFA). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua bước phát hiện huỳnh quang cuối cùng. Cường độ huỳnh quang tỷ lệ với nồng độ kháng thể trong mẫu bệnh phẩm.

Định nghĩa:

- ELFA: Enzyme Linked Fluorescent Assay- phương pháp enzym liên kết huỳnh quang
- HEV: Hepatitis E virus-Virus gây bệnh viêm gan E
- RFV: Relative Fluorescence Value-giá trị huỳnh quang tương đối

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HEV IgM (VD hoặc tương đương)
- Anti-HEV IgM Kit
- Controls
- Calibrators
- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C)/ (-70°C)
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm HEV IgM.

Các bước	Nội dung
1	Lấy bộ kit khỏi nơi bảo quản ở +2°C/+8°C và lấy ra các hóa chất được yêu cầu. Cẩn thận đóng kín túi đựng đầu côn SPR® và để bộ kit lại nơi bảo quản ở +2°C/+8°C. Các hóa chất có thể được sử dụng ngay lập tức
2	Sử dụng một thanh "HEVM" và một đầu côn "HEVM" SPR® cho mỗi mẫu bệnh phẩm, đối chứng hoặc hiệu chuẩn được xét nghiệm. Đảm bảo túi đựng đầu côn SPR® đã được đóng kín cẩn thận sau khi lấy đủ các đầu côn ra.
3	Xét nghiệm được xác định bằng mã "HEVM" trên thiết bị. Hiệu chuẩn phải được xác định bằng "S1" và được chạy hai lần. Các đối chứng được xác định bằng "C1" and "C2" phải được chạy một lần.
4	Nếu cần, làm trong mẫu bệnh phẩm bằng ly tâm
5	Trộn hiệu chuẩn và các đối chứng bằng máy trộn Vortex
6	Trước khi hút bằng pipette, đảm bảo rằng các mẫu, hiệu chuẩn và các đối chứng không có bọt khí
7	Đặt các đầu côn "HEVM" SPR® và các thanh hóa chất "HEVM" vào máy. Kiểm tra để đảm bảo màu của các nhãn với mã xét nghiệm trên các đầu côn SPR®s và các thanh hóa chất là trùng nhau.
8	Bắt đầu xét nghiệm như mô tả trong Hướng dẫn sử dụng máy. Tất cả các bước xét nghiệm được thực hiện tự động trên máy.

Các bước	Nội dung
9	Đóng nắp các ống và đặt trở lại nhiệt độ 2-8°C sau khi hút. Xét nghiệm sẽ hoàn thành trong xấp xỉ 40 phút. Sau khi xét nghiệm hoàn thành, lấy các SPR®s và thanh hóa chất ra khỏi máy
10	Loại bỏ các SPR®s và thanh hóa chất vào thùng chứa phù hợp

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Kết quả của xét nghiệm được biểu thị ở giá trị RFV (Giá trị huỳnh quang tương đối) được tính bằng cách lấy kết quả của lần đọc sau cùng trừ đi kết quả của lần đọc nền. Kết quả RFV của bệnh nhân được phiên giải bởi hệ thống như sau:

$$\text{Giá trị xét nghiệm} = \text{RFV bệnh nhân} / \text{RFV hiệu chuẩn}$$

Phiên giải các kết quả theo giá trị xét nghiệm như sau:

Chỉ số	Kết quả	Phiên giải/ Khuyến nghị
< 1.00	Âm tính	Mẫu được xem là âm tính
≥ 1.00	Dương tính	Mẫu được xem là dương tính

Phiên giải các kết quả xét nghiệm nên được thực hiện xem xét bệnh sử của bệnh nhân, và kết quả của các xét nghiệm khác đã được thực hiện.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)

- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

312. HEV IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm để phát hiện định lượng kháng thể HEV IgG trong huyết thanh hoặc huyết tương người. Xét nghiệm này bổ sung cho các xét nghiệm Anti-HEV IgM, để hỗ trợ chẩn đoán nhiễm viêm gan E ở bệnh nhân có các triệu chứng và/hoặc dấu hiệu lâm sàng của viêm gan bằng kỹ thuật enzyme liên kết huỳnh quang (ELFA).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật enzyme liên kết huỳnh quang (ELFA). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua bước phát hiện huỳnh quang cuối cùng. Cường độ huỳnh quang tỷ lệ với nồng độ kháng thể trong mẫu bệnh phẩm.

Định nghĩa:

- ELFA: Enzyme Linked Fluorescent Assay- phương pháp enzym liên kết huỳnh quang
- HEV: Hepatitis E virus-Virus gây bệnh viêm gan E
- RFV: Relative Fluorescence Value-giá trị huỳnh quang tương đối

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HEV IgG (VD hoặc tương đương)
- Anti-HEV IgG Kit
- Controls
- Calibrators
- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C)/ (-70°C)
- Dàn máy miễn dịch tự động
- Máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm HEV IgG (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Lấy bộ kit khỏi nơi bảo quản ở +2°C/+8°C và lấy ra các hóa chất được yêu cầu. Cẩn thận đóng kín túi đựng đầu côn SPR® và để bộ kit lại nơi bảo quản ở +2°C/+8°C. Các hóa chất có thể được sử dụng ngay lập tức
2	Sử dụng một thanh "HEVG" và một đầu côn "HEVG" SPR® cho mỗi mẫu bệnh phẩm, đối chứng hoặc hiệu chuẩn được xét nghiệm. Đảm bảo túi đựng đầu côn SPR® đã được đóng kín cẩn thận sau khi lấy đủ các đầu côn ra.
3	Xét nghiệm được xác định bằng mã "HEVG" trên thiết bị. Hiệu chuẩn phải được xác định bằng "S1" và được chạy hai lần. Các đối chứng được xác định bằng "C1" and "C2" phải được chạy một lần.
4	Nếu cần, làm trong mẫu bệnh phẩm bằng ly tâm
5	Trộn hiệu chuẩn và các đối chứng bằng máy trộn Vortex
6	Trước khi hút bằng pipette, đảm bảo rằng các mẫu, hiệu chuẩn và các đối chứng không có bọt khí
7	Đặt các đầu côn "HEVG" SPR® và các thanh hóa chất "HEVG" vào máy. Kiểm tra để đảm bảo màu của các nhãn với mã xét nghiệm trên các đầu côn SPR®s và các thanh hóa chất là trùng nhau.
8	Bắt đầu xét nghiệm như mô tả trong Hướng dẫn sử dụng máy. Tất cả các bước xét nghiệm được thực hiện tự động trên máy.

Các bước	Nội dung
9	Đóng nắp các ống và đặt trở lại nhiệt độ 2-8°C sau khi hút. Xét nghiệm sẽ hoàn thành trong xấp xỉ 40 phút. Sau khi xét nghiệm hoàn thành, lấy các SPR®s và thanh hóa chất ra khỏi máy
10	Loại bỏ các SPR®s và thanh hóa chất vào thùng chứa phù hợp

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Giá trị ngưỡng lâm sàng cho xét nghiệm, cho phép phiên giải xét nghiệm, được xác định bằng cách sử dụng một đường cong ROC và các mẫu đặc trưng lâm sàng. Nồng độ giá trị ngưỡng cho xét nghiệm Anti-HEV IgG đã được xác định là 0.56 U/mL.

Phiên giải các kết quả theo giá trị xét nghiệm như sau:

Nồng độ (U/mL)	Kết quả	Phiên giải/ Khuyến nghị
< 0.56	Âm tính	Mẫu được xem là âm tính
≥ 0.56	Dương tính	Mẫu được xem là dương tính

Phiên giải các kết quả xét nghiệm nên được thực hiện xem xét bệnh sử của bệnh nhân, và kết quả của các xét nghiệm khác đã được thực hiện

Bất kỳ kết quả nào không tương ứng với lịch sử lâm sàng của bệnh nhân có thể là do việc bảo trì thiết bị không đầy đủ

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

313. HIV Ab test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định định tính kháng thể kháng HIV-1 và HIV-2 trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng nguyên có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng nguyên đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Ống đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý

- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu máu được lấy vào ống đựng máu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước tiến hành	Xét nghiệm định tính HIV
1	Sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Sắp xếp bệnh phẩm theo thứ tự, ghi sơ đồ mẫu
3	Mở bao lấy card ra để trên mặt phẳng khô và sạch
4	Nhỏ 10µl huyết thanh hay huyết tương vào vùng nhỏ mẫu.

Các bước tiến hành	Xét nghiệm định tính HIV
5	Nhỏ thêm 3 giọt (khoảng 90 μ l) dung dịch pha loãng (diluent) vào vùng nhỏ mẫu.
6	Ghi thời gian nhỏ bệnh phẩm
7	Chờ tối thiểu 10-15 phút và đọc kết quả. Không đọc kết quả sau 20 phút.
8	Ghi thời gian đọc kết quả và kết quả xét nghiệm

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể gặp khi:
 - + Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
 - + Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.
- Xử lý: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

314. HIV Ag/Ab test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên p24 và kháng thể kháng HIV-1 và HIV-2 trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể/kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng nguyên/kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng nguyên/kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Ống đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý

- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu máu được lấy vào ống đựng máu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Xét nghiệm phát hiện kháng nguyên-kháng thể HIV
Đối với huyết thanh/huyết tương	
1	Tách rời từng thanh xét nghiệm rồi xé bao bảo vệ thanh xét nghiệm. Ghi mã bệnh phẩm xét nghiệm tương ứng
2	Nhỏ 50 µl huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm

3	Chờ 20 phút đọc kết quả
Đối với mẫu toàn phần	
1	Tách rời từng thanh xét nghiệm rồi bóc vỏ Ghi mã bệnh phẩm xét nghiệm tương ứng
2	Nhỏ 50 µl huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm
3	Đợi một phút, sau đó cho một giọt dung dịch đệm Chase vào vùng nhỏ mẫu bệnh phẩm
4	Chờ 20 phút đọc kết quả
	<i>Lưu ý (đối với cả huyết thanh, huyết tương và mẫu toàn phần):</i> Không đọc kết quả sau quá 30 phút

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch chứng.
- Dương tính:
 - + Có phản ứng với kháng thể: Xuất hiện 2 vạch đỏ ở vùng chứng và vùng kháng thể.
 - + Có phản ứng với kháng nguyên (p24): Xuất hiện 2 vạch đỏ ở vùng chứng và vùng kháng nguyên.
 - + Có phản ứng với kháng thể và kháng nguyên (p24): Xuất hiện 3 vạch đỏ ở vùng chứng, vùng kháng thể và vùng kháng nguyên.
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể gặp khi:
 - + Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
 - + Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.
- Xử lý: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
 - Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- * Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

315. HIV Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện xác định định tính kháng thể các loại kháng thể của virus HIV1 và/hoặc HIV2 trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Ví dụ: Bộ sinh phẩm HIV1/2 version 2 (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiết trùng
- Ống Falcon 15ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Ví dụ: Bộ sinh phẩm HIV1/2 version 2 (VD hoặc tương đương)

Các bước	Xét nghiệm định tính
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa. Pha loãng với tỉ lệ 1:20 trong nước cất để thu được dung dịch rửa sẵn dùng
4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
5	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm. 25 µl chất pha loãng vào mỗi giếng 75 µl huyết thanh chứng âm vào giếng A1 75 µl huyết thanh chứng ngưỡng vào các giếng B1, C1 và D1 75 µl huyết thanh chứng dương trong các giếng E1 75 µl mẫu 1 trong giếng F1 75 µl mẫu 2 trong giếng G1..
6	Trộn đều hoặc lắc phiên vi lượng sau khi thực hiện bước hút nhỏ
7	Đậy nắp và ủ ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ trong 30 ± 5 phút
8	Rửa phiên nhựa.
9	Chuẩn bị chất cộng hợp: Gõ nhẹ lọ chất thử lên mặt bàn để dễ phân chất thử bám ở nắp cao su. Cẩn thận mở nắp và rót một lọ dung dịch chất cộng hợp pha loãng vào lọ chất cộng hợp đông khô. Đậy nắp vào để trong 10 phút rồi lắc nhẹ và lộn ngược cho dễ tan
10	Nhỏ 100 µl dung dịch chất cộng hợp vào tất cả các giếng
11	Đậy nắp và ủ trong 30 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng
12	Rửa phiên nhựa
13	Chuẩn bị dung dịch hiện màu: Pha loãng dung dịch với tỉ lệ 1:11 trong đệm cơ chất

Các bước	Xét nghiệm định tính
14	Nhỏ 80 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
15	Ủ phiên nhựa 30 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng, không đậy nắp và tránh ánh sáng
16	Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng
17	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 4-30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.

Tính giá trị ngưỡng:

- Tính giá trị trung bình của độ hấp thụ đối với huyết thanh chứng ngưỡng ($\overline{ODR4}$)

Ví dụ: Chứng dương R4

$$\overline{ODR4} = \frac{OD(B1) + OD(C1) + OD(D1)}{3}$$

Giá trị ngưỡng Cut-off (CO) được chia theo tỉ lệ:

$$C.O = \frac{\overline{ODR4}}{10}$$

Phiên giải và báo cáo kết quả:

- Dương tính: nếu OD bệnh phẩm $\geq$ CO
- Nghi ngờ: nếu $C.O - 10\% < OD \text{ bệnh phẩm} < C.O$
- Âm tính: nếu OD bệnh phẩm $< CO$

Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

316. HIV Ag/Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên, kháng thể HIV Ag/Ab trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng nguyên, kháng thể HIV Ag/Ab dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- Tube lưu mẫu dương tính
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Lấy sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm. Lập sơ đồ phân phối mẫu
2	Chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị chất cộng hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất
3	Lấy phiến nhựa và các thanh giếng. Nhỏ chất cộng hợp 1 vào mỗi giếng phản ứng.
4	Nhỏ chứng dương HIV Ag; Chứng dương HIV Ab; Chứng âm (R3), mẫu EQC (nếu có), mẫu bệnh phẩm vào các giếng tiếp theo như hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Đậy và ủ phiến phản ứng ở nhiệt độ thích hợp trong thời gian quy định theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
6	Rửa phiến phản ứng bằng máy rửa theo chương trình hướng dẫn
7	Nhỏ cộng hợp 2
8	Đậy phiến phản ứng và ủ ở nhiệt độ phòng (18°C - 30°C) trong thời gian quy định theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
9	Rửa phiến phản ứng bằng máy rửa theo chương trình hướng dẫn
10	Nhỏ hiện màu
11	Đề ở nhiệt độ phòng (18°C – 30°C) và tránh ánh sáng theo hướng dẫn.
12	Dừng phản ứng. Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- Độ hấp phụ của mỗi chứng âm phải nhỏ hơn 0,170.
- Nếu một chứng âm $OD > 0.17$ thì bỏ đi và tính trung bình hai kết quả còn lại. Đến đây chỉ một trong hai trị số bị bỏ đi mà thôi.
- Độ hấp phụ trung bình của các chứng âm phải nhỏ hơn 0,150
- Độ hấp phụ của chứng dương HIV Ab phải lớn hơn 0,9
- Độ hấp phụ của chứng dương HIV Ag phải lớn hơn 0,9

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Tính độ hấp thụ trung bình của chứng âm
- Tính giá trị ngưỡng (CO):
- Cut-off (CO) = OD trung bình chứng âm + 0,200
- Nhận định kết quả:
- Dương tính: Mẫu thử có $OD \geq C.O$
- Âm tính: Mẫu thử có $OD < C.O$
- Những mẫu dương tính cần phải được kiểm tra lại bằng hai bộ sinh phẩm khác có nguyên lý chuẩn bị kháng nguyên khác nhau để khẳng định mẫu đó là dương tính với HIV theo qui định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

317. HIV Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện xác định định tính kháng thể các loại kháng thể của virus HIV1 và/hoặc HIV2 trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HIV1/2 version 2 (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng

- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Bộ sinh phẩm HIV1/2 version 2 (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số (dán code), sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa, cộng hợp, dung dịch hiện màu...
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng 20 mẫu và chọn test sử dụng. Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: <i>Nhập thủ công:</i> Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm HIV Ab trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm HIV Ab bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm.

Các bước	Nội dung
	<i>Nhập bệnh nhân có mã vạch:</i> Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã :NC, CO, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm: 25 µl chất pha loãng vào mỗi giếng; 75 µl huyết thanh chứng âm vào giếng A1; 75 µl huyết thanh chứng ngưỡng vào các giếng B1, C1 và D1; 75 µl huyết thanh chứng dương trong các giếng E1; 75 µl mẫu 1 trong giếng F1; 75 µl mẫu 2 trong giếng G1.. Lắc phiến vi lượng sau khi thực hiện bước hút nhỏ Ủ ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 30 ± 5 phút Rửa phiến nhựa Nhỏ 100 µl dung dịch chất cộng hợp vào tất cả các giếng Ủ trong 30 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng Rửa phiến nhựa Nhỏ 80 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng Ủ phiến nhựa 30 ± 5 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 4-30 phút sau khi dừng phản ứng
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tầm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy:

Các bước	Nội dung
	Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

Phiên giải và báo cáo kết quả:

Các kết quả xét nghiệm được tính toán bằng phương pháp giá trị ngưỡng được cài đặt trên máy tự động bằng cách:

Tính giá trị ngưỡng:

- Tính giá trị trung bình của độ hấp thụ đối với huyết thanh chứng ngưỡng ($\overline{ODR4}$)

Ví dụ: Chứng dương R4

$$\overline{ODR4} = \frac{OD(B1) + OD(C1) + OD(D1)}{3}$$

Giá trị ngưỡng Cut-off (CO) được chia theo tỉ lệ:

$$C.O = \frac{\overline{ODR4}}{10}$$

Phiên giải và báo cáo kết quả:

- Dương tính: nếu OD bệnh phẩm $\geq$ CO
- Nghi ngờ: nếu $C.O - 10\% < OD \text{ bệnh phẩm} < C.O$
- Âm tính: nếu OD bệnh phẩm $< CO$

Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

318. HIV Ag/Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên, kháng thể HIV Ag/Ab trong huyết thanh, huyết tương.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy. Chuẩn bị các hóa chất kèm theo.
2	Kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không.
3	Chạy chứng (Tham khảo qui trình chạy chứng...)
4	Chạy mẫu theo các bước sau
4.1	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 4.2 – 4.9:	
4.2	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm.
4.3	Hút huyết thanh/huyết tương vào cốc đựng mẫu tương ứng.
4.4	Vào màn hình thao tác theo hướng dẫn của nhà sản xuất
4.5	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
4.6	Chọn test HIV
4.7	Nhập số rack và vị trí mẫu
4.8	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần xét nghiệm (hoặc cốc chứa mẫu bệnh phẩm) lên Rack đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
4.9	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 4.10 – 4.12:	
4.10	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm
4.11	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack quy định, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
4.12	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC.
- Nếu một trong các điều kiện không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2 Đọc kết quả:

- Đọc kết quả và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kết quả được diễn giải như sau:

- + Nếu $COI < 0.90$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với HIV.
- + Nếu $0.90 \leq COI \leq 1.0$: mẫu bệnh phẩm này nằm ở giới hạn ngưỡng và cần phải kiểm tra lại.
- + Nếu $COI > 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với thử nghiệm HIV

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.
- Trong một số rất ít trường hợp bệnh lý miễn dịch kháng thể gammopathy đặc biệt typ IgM (Waldenstroms macroglobulinemia) có thể gây nên kết quả không xác thực.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

319. HIV khẳng định

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Khẳng định chẩn đoán nhiễm HIV ở người trên 18 tháng tuổi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng chiến lược III áp dụng cho các trường hợp nhiễm HIV ở những người trên 18 tháng tuổi bằng ba loại sinh phẩm với nguyên lý và/hoặc chuẩn bị kháng nguyên khác nhau.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán 1
- Tiêu hao sinh phẩm 1 cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Sinh phẩm chẩn đoán 2
- Tiêu hao sinh phẩm 2 cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Sinh phẩm chẩn đoán 3
- Tiêu hao sinh phẩm 3 cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml

- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy xét nghiệm và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 giờ (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1.1.	Xét nghiệm sử dụng sinh phẩm 1 có độ nhạy cao phát hiện được cả kháng nguyên và kháng thể HIV để sàng lọc (XN SP1) Nếu xét nghiệm SP1 âm tính tiếp tục thực hiện bước 2.1 Nếu xét nghiệm SP1 dương tính, thực hiện bước 1.2
1.2	Xét nghiệm sử dụng sinh phẩm thứ 2 có độ đặc hiệu cao (XN SP2) Nếu xét nghiệm SP2 âm tính, thực hiện bước 1.3 Nếu xét nghiệm SP2 dương tính, thực hiện bước 1.4
1.3	Xét nghiệm lại với sinh phẩm 1 (SP1) và sinh phẩm 2 (SP2) Nếu cả 2 xét nghiệm âm tính, thực hiện bước 2.1 Nếu cả 2 xét nghiệm dương tính, thực hiện bước 1.4 Nếu xét nghiệm SP1 dương tính, SP2 âm tính thực hiện bước 1.4
1.4	Xét nghiệm sử dụng sinh phẩm thứ 3 có độ đặc hiệu cao (XN SP3) Nếu xét nghiệm SP3 âm tính, SP1 và SP2 dương tính thực hiện bước 2.2 Nếu xét nghiệm SP3 âm tính, SP1 dương tính và SP2 âm tính thực hiện bước 2.2* Nếu xét nghiệm SP3 dương tính, SP1 dương tính và SP2 âm tính thực hiện bước 2.2 Nếu cả 3 xét nghiệm SP1, SP2 và SP3 dương tính thực hiện bước 2.3
2.	Biện luận trả kết quả
2.1.	Trả kết quả: âm tính
2.2.	Trả kết quả: không xác định và hẹn xét nghiệm lại sau 14 ngày : Sau 14 ngày: - Kết quả âm tính: kết luận là âm tính. - Kết quả dương tính theo chiến lược 3, kết luận là dương tính.

	- Kết quả lần 2 không có sự thay đổi hoặc giảm mức độ phản ứng với cùng loại sinh phẩm đã được sử dụng trong 2 lần xét nghiệm và không có yếu tố nguy cơ cao: kết luận âm tính. - Kết quả lần 2 có sự gia tăng mức độ phản ứng với cùng loại sinh phẩm đã được sử dụng trong 2 lần xét nghiệm; hoặc có sự nghi ngờ chuyển đổi huyết thanh; hoặc có yếu tố nguy cơ cao dù không có sự thay đổi mức độ phản ứng với cùng loại sinh phẩm đã được sử dụng trong lần xét nghiệm 1: liên hệ phòng xét nghiệm tham chiếu tuyến trên. + * Trường hợp SP1(+), SP2(-) và SP3(-), bệnh nhân không có yếu tố nguy cơ, kết luận là âm tính (Thận trọng). Nếu SP1 phát hiện cả kháng nguyên và kháng thể, SP2 và SP3 chỉ phát hiện kháng thể cần xét nghiệm lại sau 14 ngày.
2.3.	Trả kết quả: dương tính.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Âm tính: Không có kháng thể kháng HIV trong mẫu xét nghiệm.
- Dương tính: Khẳng định tình trạng nhiễm HIV.
- Không xác định: Trường hợp nghi ngờ không kết luận âm tính hoặc dương tính. Cần xét nghiệm lại sau 2 tuần. Sau 2 tuần nếu :
 - + Kết quả âm tính kết luận là âm tính.
 - + Kết quả dương tính theo chiến lược 3, kết luận là dương tính.
 - + Kết quả lần 2 không có sự thay đổi về mức độ phản ứng giữa hai lần xét nghiệm, bệnh nhân không thuộc đối tượng có hành vi nguy cơ cao thì kết luận là âm tính.
 - + Kết quả lần 2 có sự thay đổi hoặc nghi ngờ chuyển đổi huyết thanh, xét nghiệm lại lần 3 sau 2 tuần. Nếu kết quả lần 3 vẫn không xác định thì kết luận là âm tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 2674/QĐ-BYT ngày 27/4/2018 ban hành hướng dẫn Quốc gia xét nghiệm HIV*, 2018.
4. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

320. HIV DNA PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt ADN của Human Immunodeficiency Virus (HIV) trong mẫu bệnh phẩm máu của bệnh nhân nhiễm HIV bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của HIV được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, sự có mặt của HIV ADN được xác định dựa vào kích thước của sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng so với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy đọc gel
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 μ l – 1000 μ l

- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương, dịch cơ thể
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HIV chuẩn hoặc mẫu HIV dương tính đã được xác định. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm và tiến hành đúng. Chứng NTC đảm bảo quá trình pha mix không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit PCR, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.

- Pha Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

Quy trình PCR

- Chuyển 5 µl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết, chứng âm, chứng dương, chứng NTC.

TT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂	1
3	Mồi xuôi	1
4	Mồi ngược	1
5	H ₂ O	20
6	ADN khuôn	2
7	Tổng thể tích	50

- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	40 chu kỳ
	57 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm: Nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách, phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy
- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có sản phẩm PCR, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có sản phẩm PCR, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có sản phẩm PCR, mẫu chứng âm không có sản phẩm, kết quả đó sẽ được sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

321. HIV DNA Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt ADN của Human Immunodeficiency Virus (HIV) trong mẫu bệnh phẩm máu của bệnh nhân nhiễm HIV bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của HIV được khuếch đại và phát hiện bằng kỹ thuật Real-time PCR sử dụng cặp mồi và probe đặc hiệu. Sự có mặt của HIV DNA được xác định dựa trên đường đồ thị huỳnh quang của phản ứng Real-time PCR.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên tục
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng

- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy Real-time PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương, dịch cơ thể

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HIV dương tính đã được xác định. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống master mix trong kit sinh phẩm sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.
- Chia Master Mix vào mỗi ống phản ứng PCR (thể tích tùy theo loại sinh phẩm sử dụng):

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂ (25 mM)	4
3	Mồi xuôi	2
4	Mồi ngược	2
5	Probe huỳnh quang	1
6	H ₂ O	11
7	DNA khuôn	5
8	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

- Chuyển sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	95	5 phút	1
2	95	20 giây	45
	60	1 phút (đọc huỳnh quang)	
3	10	5 phút	1

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Thực hiện phân tích kết quả theo hướng dẫn của loại sinh phẩm hóa chất đang sử dụng.
- Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.
- Chứng âm không có đường huỳnh quang nào xuất hiện hoặc xuất hiện đồ thị huỳnh quang dưới đường giới hạn cơ bản.
- Chứng nội tại phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.
- Đường đồ thị huỳnh quang của mẫu có thể xuất hiện hoặc không xuất hiện trên đường giới hạn, căn cứ vào đó để kết luận kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm: Nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách, phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy
- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có đồ thị huỳnh quang, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có đồ thị huỳnh quang, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có đồ thị huỳnh quang, mẫu chứng âm không có đồ thị huỳnh quang, kết quả đó sẽ được sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

322. HIV đo tải lượng Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định số lượng bản sao của Human Immunodeficiency Virus (HIV) trong mẫu bệnh phẩm máu của bệnh nhân nhiễm HIV bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của HIV được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR và khuếch đại bằng kỹ thuật real-time PCR. Số lượng bản sao của HIV có trong mẫu bệnh phẩm được xác định dựa vào đường đồ thị tuyến tính của các loại chứng chuẩn đã biết trước nồng độ.

Định nghĩa

- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên tục
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy Real-time PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 μ l – 1000 μ l
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương, dịch cơ thể
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HIV chuẩn hoặc mẫu HIV dương tính đã xác định. Tách chiết cùng với các mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 6$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 6 loại chứng bao gồm: 04 chứng dương đã biết trước nồng độ để xây dựng đường độ thị tuyến tính; chứng âm NC để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm và tiến hành đúng; chứng NTC để đảm bảo quá trình pha mix không bị nhiễm.

- Làm tan đá các ống trong kit PCR, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.

- Pha Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂	1
3	Mồi xuôi	1
4	Mồi ngược	1
5	Probe	1
6	H ₂ O	16
7	ARN khuôn (chứng chuẩn)	5
8	Tổng thể tích	50

Lưu ý: Các chứng chuẩn có thể chạy cùng mẻ xét nghiệm hoặc chạy riêng biệt tùy thuộc vào nhà sản xuất Kit.

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ARN cùng các chứng dương, chứng NTC và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ARN tách chiết, chứng âm, chứng dương, chứng NTC
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	3 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	45 chu kỳ
	60 °C	30 giây (đọc huỳnh quang)	
	72 °C	1 phút	
4	4 °C	Bảo quản	

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản, chứng âm và NTC không có bất kì đường đồ thị huỳnh quang nào xuất hiện dưới đường cơ bản.

- Các mẫu chứng dương phải có đường đồ thị huỳnh quang xuất hiện tương ứng với nồng độ biết trước.
- Xây dựng đường đồ thị tuyến tính của 04 mẫu chứng chuẩn.
- Tính nồng độ HIV trong một đơn vị thể tích bệnh phẩm dựa vào kết quả đường đồ thị tuyến tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm: Nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách, phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy
- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có đồ thị huỳnh quang, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có đồ thị huỳnh quang, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có đồ thị huỳnh quang, mẫu chứng âm không có đồ thị huỳnh quang, kết quả đó sẽ được sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT

- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

323. HIV đo tải lượng hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và định lượng HIV RNA trong huyết tương người trên hệ thống máy PCR tự động xử lý mẫu, khuếch đại và phát hiện.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR, là phản ứng PCR trong đó phân tử RNA được phiên mã ngược tạo cDNA và kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. HIV master mix chứa đoạn dò kép phát hiện đặc hiệu cho các trình tự đích HIV và chứng nội chuẩn RNA-QS (Ribonucleic acid - Quantitation Standard). Các đoạn dò được đánh dấu với các chất phát huỳnh quang đặc hiệu với đích, cho phép phát hiện đồng thời HIV mục tiêu và RNA-QS trong hai kênh đích khác nhau. Với mỗi chu kỳ PCR, số lượng của đoạn dò đã phân tách được tạo ra càng tăng và tín hiệu tích lũy của chất phát huỳnh quang đồng thời tăng. Việc phát hiện và phân biệt real-time các sản phẩm PCR được thực hiện bằng cách đo huỳnh quang của các chất phát huỳnh quang được giải phóng ra tương ứng với HIV và RNA-QS.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương từ máu chống đông bằng EDTA.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

1	Đăng nhập hệ thống
2	Nạp mẫu lên hệ thống • Nạp giá mẫu thử lên hệ thống • Hệ thống tự động chuẩn bị • Tạo lệnh xét nghiệm
3	Thêm thuốc thử và vật tư tiêu hao theo yêu cầu của hệ thống • Nạp đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm • Nạp giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) • Nạp các đầu tip xử lý • Nạp các đầu tip rửa giải • Nạp các đĩa xử lý • Nạp các đĩa chất thải lỏng • Nạp các đĩa khuếch đại • Nạp hộp cassette MGP • Thêm chất pha loãng mẫu • Thêm thuốc thử ly giải • Thêm đệm rửa
4	Bắt đầu chạy xét nghiệm bằng cách chọn nút Start processing trên giao diện người sử dụng, tất cả các mẻ chạy sau đó sẽ được tự động bắt đầu nếu không bị hoãn thủ công bởi người sử dụng.
5	Kiểm tra và xuất kết quả
6	Lấy ra và đậy nắp bất kỳ ống mẫu nào đáp ứng yêu cầu thể tích tối thiểu để sử dụng thêm nếu cần Vệ sinh thiết bị • Lấy giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) đã hết ra khỏi máy • Lấy đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm đã hết ra khỏi máy • Dọn khay đựng các đĩa khuếch đại • Đổ bỏ chất thải lỏng • Đổ bỏ chất thải rắn

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

a. Đánh giá theo yêu cầu của nhà sản xuất

- Hệ thống tự động xác định nồng độ HIV-RNA cho mẫu thử và mẫu chứng với đơn vị là copies/ml.
- Mẻ xét nghiệm hợp lệ nếu không xuất hiện cờ hiệu cho tất cả ba mẫu chứng âm, chứng dương thấp và chứng dương cao.
- Kết quả mẫu chứng âm tính được hiển thị là (–) C.
- Kết quả mẫu chứng dương tính nồng độ thấp và cao được hiển thị là HxV L (+) C và HxV H (+) C.
- Kết quả được tự động gán là không hợp lệ bởi phần mềm khi kết quả của mẫu chứng âm tính hoặc dương tính không đạt.

c. Đánh giá theo yêu cầu phòng xét nghiệm

Đánh giá QC (NC, LPC, HPC) theo hướng dẫn theo dõi QC của phòng xét nghiệm.

4.2.2. Đọc kết quả:

c. Đọc kết quả của mẫu chứng trong ứng dụng “Controls”.

- Valid: nếu tất cả kết quả được báo cáo hợp lệ
- Invalid: nếu tất cả kết quả được báo cáo là không hợp lệ
 - + Mẫu chứng được hiển thị ‘Invalid’ sẽ xuất hiện cờ hiệu ở cột “Flags”. Thông tin thêm về lý do mẫu chứng được báo cáo là không hợp lệ, bao gồm cả thông tin cờ hiệu được hiển thị trong chế độ xem thông tin chi tiết.
 - + Nếu một trong các mẫu chứng dương tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các mẫu chứng dương tính và mẫu thử có liên quan.
 - + Nếu mẫu chứng âm tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các chứng và mẫu thử có liên quan.

d. Đọc kết quả của mẫu bệnh phẩm

Một mẻ xét nghiệm hợp lệ có thể bao gồm kết quả mẫu hợp lệ và không hợp lệ.

Kết quả	Biện luận
Target Not Detected	Không phát hiện RNA HIV. Báo cáo kết quả là “Không phát hiện HIV”.
< Titer Min	Nồng độ nằm dưới Giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của xét nghiệm. Báo cáo kết quả là “Phát hiện HIV, thấp hơn (Nồng độ tối thiểu).” Nồng độ tối thiểu = 20 cp/mL và 33 IU/mL (500 µL huyết tương) Nồng độ tối thiểu = 50 cp/mL và 83 IU/mL (200 µL huyết tương) Nồng độ tối thiểu = 790 cp/mL và 1317 IU/mL (PSC)
Titer	Nồng độ nằm trong Khoảng tuyến tính của xét nghiệm - lớn hơn hoặc bằng Nồng độ tối thiểu và nhỏ hơn hoặc bằng Nồng độ tối đa. Báo cáo kết quả là “Phát hiện (Nồng độ) HIV-1”.
> Titer Max ^a	Nồng độ nằm trên Giới hạn định lượng trên (ULOQ) của xét nghiệm. Báo cáo kết quả là “Phát hiện HIV, cao hơn (Nồng độ tối đa).” Nồng độ tối đa = 1.00E+07 cp/mL và 1.67E+07 IU/mL (500 µL, 200 µL và PSC)

^a Kết quả mẫu > Nồng độ tối đa là do những mẫu dương tính với HIV được phát hiện với nồng độ nằm trên giới hạn định lượng trên (ULOQ). Nếu muốn thu được kết quả định lượng, phải pha loãng mẫu ban đầu với huyết tương chống đông bằng EDTA hoặc huyết thanh âm tính với HIV, tùy thuộc vào loại mẫu ban đầu, và xét nghiệm nên được thực hiện lại. Nhân kết quả xét nghiệm thu được với hệ số pha loãng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kết quả đo tải lượng HIV bị ảnh hưởng khi nồng độ hemoglobin trong mẫu $\geq 250\text{mg/dL}$.
- Kết quả có thể âm tính giả trong các trường hợp sau:
 - + Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng: heparin
 - + Môi trường:
 - Sử dụng quá nhiều a-xít hypochlorous trong khử nhiễm phòng thí nghiệm.
 - Sử dụng găng có bột talc khi thực hiện xét nghiệm.
- Kết quả có thể dương tính giả trong các trường hợp sau:
 - + Có sự lây nhiễm chéo giữa các mẫu bệnh phẩm.
 - + Lây nhiễm các sản phẩm khuyếch đại từ lần phản ứng trước.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

324. Dengue Virus NS1Ag test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm phát hiện định tính kháng nguyên virus Dengue NS1Ag trong huyết thanh, huyết tương và máu toàn phần bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Thanh màng mao dẫn được phủ trước bởi kháng thể kháng kháng nguyên Dengue NS1 trên vùng vạch thử. Kháng thể kháng kháng nguyên Dengue NS1 - cộng hợp keo vàng và mẫu huyết thanh, huyết tương hay máu toàn phần di chuyển sắc ký dọc trên màng và tới vùng vạch thử (T) và tạo nên vạch nhìn thấy do tạo thành phức hợp kháng thể - kháng nguyên - kháng thể.

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Dengue NS1Ag (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 200ul
- Tube đựng bệnh phẩm vô trùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl
- Đồng hồ bấm giây
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu huyết thanh, huyết tương hay máu toàn phần.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám bệnh chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước	Nội dung
1	Đánh số, viết sơ đồ và sắp xếp bệnh phẩm theo thứ tự.
2	Lấy thanh thử ra khỏi túi đựng và đặt lên bề mặt khô, phẳng.
3	Dùng Pipet nhựa có sẵn trong bộ sinh phẩm hút mẫu rồi nhỏ 3 giọt (khoảng 100 µl) vào giếng mẫu (S).
4	Đọc kết quả trong vòng 15-20 phút. Không đọc kết quả sau 20 phút.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào sổ hoặc file mềm. Có thể in ra kết quả đã nhập vào phần mềm quản lý xét nghiệm.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C (Control).

Thử nghiệm chỉ có giá trị khi tại vùng kiểm chứng có vạch màu đỏ. Nếu vạch chứng không xuất hiện sau khi thử nghiệm, kết quả này không có giá trị và phải làm lại.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- + Dương tính: Xuất hiện vạch đỏ ở cả vùng chứng (C) và vùng đọc kết quả bệnh nhân (T). Bất kỳ màu đỏ nào thấy được ở vùng đọc kết quả bệnh nhân đều được đọc kết quả là dương tính.
- + Âm tính (Một vạch): Chỉ xuất hiện vạch đỏ ở vùng chứng (C) và không xuất hiện vạch đỏ ở vùng đọc kết quả bệnh nhân.
- + Kết quả không có giá trị: Không xuất hiện vạch tại vùng chứng, có thể do lượng mẫu xét nghiệm không đủ hoặc kỹ thuật thực hiện sai. Cần phải làm lại xét nghiệm trên thanh thử mới.

Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Khuyến cáo kiểm tra lại kết quả nghi ngờ bằng cách xét nghiệm mẫu thử hoặc lấy mẫu mới xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

325. Dengue virus IgA test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định nhanh kháng thể IgA của virus Dengue trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần của người bằng kỹ thuật test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng nguyên có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng nguyên đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm thử nghiệm sắc ký miễn dịch Dengue IgA
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Ống đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý

- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu máu được lấy vào ống đựng máu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước tiến hành	Xét nghiệm định tính HIV
1	Đề mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút)
2	Chuẩn bị test, đánh dấu tên bệnh nhân trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài

Các bước tiến hành	Xét nghiệm định tính HIV
3	Cho 25 µl bệnh phẩm vào giếng số 1 (giếng nhỏ bệnh phẩm hình vuông)
4	Khi bệnh phẩm thấm tới vạch chỉ thị màu xanh, nhỏ 3 giọt dung dịch đệm vào giếng số 2 hình oval
5	Kéo miếng mi ca mỏng có đánh dấu chữ “Dengue IgA” ở đầu thanh thử cho đến khi cảm thấy có lực cản không kéo được nữa thì nhỏ 1 giọt dung dịch đệm vào giếng nhỏ bệnh phẩm
6	Đọc kết quả trong vòng 20 phút

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể gặp khi:
 - + Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
 - + Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

- Xử lý: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

326. Dengue virus IgM/IgG test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM/IgG kháng virus dengue trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần bằng kỹ thuật test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng nguyên có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch Dengue IgM-IgG
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý

- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu máu được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Để Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Bóc vỏ nhôm lấy thanh thử đặt lên bề mặt phẳng
3	Nhỏ bệnh phẩm vào giếng nhỏ bệnh phẩm hình tròn (S). Chờ cho huyết thanh thấm hút hết vào phần thấm bệnh phẩm ở giếng tròn.

Các bước	Nội dung
4	Giữ cho lọ buffer thẳng đứng và cao hơn giếng hình chữ nhật khoảng 1 cm, nhỏ 2 giọt buffer vào giếng hình chữ nhật ở phần đầu của thanh thử.
5	Đọc kết quả sau 15 phút - 20 phút <i>Lưu ý: Mọi kết quả đọc sau quá 20 phút đều không có giá trị và phải thử nghiệm lại.</i>

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch Chứng

4.2.2 Đọc kết quả:

Nhiễm trùng tiên phát

Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgM và vùng chứng → Thử nghiệm dương tính với kháng thể IgM và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue tiên phát.

* Nhiễm trùng thứ phát

- Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgM, IgG và vùng chứng → Kháng thể IgM và IgG dương tính và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue thứ phát.
- Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgG và vùng chứng → Kháng thể IgG dương tính và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue thứ phát.

* Âm tính

Vạch màu hồng chỉ xuất hiện ở vùng chứng → Không phát hiện được kháng thể IgM và IgG kháng dengue. Kiểm tra lại sau 3 - 4 ngày nếu nghi ngờ có nhiễm virus dengue.

* Không có giá trị

Không thấy vạch màu hồng xuất hiện ở vùng chứng → Thử nghiệm không có giá trị và cần phải làm lại.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi: Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

327. Dengue virus NS1Ag/IgM/IgG test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên NS1 và kháng thể IgM/IgG kháng virus dengue trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần bằng kỹ thuật test nhanh .

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên/ kháng thể có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể/kháng nguyên có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể/kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý

- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu máu được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Để Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Bóc vỏ nhôm lấy thanh thử đặt lên bề mặt phẳng
	Dengue NS1 Ag

3	Dùng pipet nhựa to có sẵn trong hộp nhỏ 3 giọt (tương đương 100 μ l) bệnh phẩm vào giếng nhỏ bệnh phẩm (S)
4	Đọc kết quả sau 15 phút - 20 phút
	Dengue IgM/IgG
5	Dùng pipet nhựa nhỏ có sẵn trong hộp hút huyết thanh/huyết tương đến vạch màu xanh (tương đương 10 μ l), nhỏ bệnh phẩm vào giếng nhỏ bệnh phẩm (S)
6	Nhỏ 4 giọt dung dịch pha loãng vào giếng hình tròn ở phần đầu của thanh thử
7	Đọc kết quả sau 15 phút - 20 phút

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch Chứng

4.2.2 Đọc kết quả:

Dengue NS1 Ag

- Âm tính: Chỉ 1 một đường màu xuất hiện ở vùng chứng.
- Dương tính: 2 đường màu xuất hiện ở vùng chứng và vùng thử nghiệm.
- Không có giá trị: Không thấy xuất hiện đường màu nào. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

Dengue IgM/IgG: Việc đánh giá kết quả cần dựa vào kết quả phối hợp của vạch thử nghiệm IgM, IgG và vạch chứng.

* Nhiễm trùng tiên phát

Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgM và vùng chứng → Thử nghiệm dương tính với kháng thể IgM và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue tiên phát.

* Nhiễm trùng thứ phát

- Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgM, IgG và vùng chứng → Kháng thể IgM và IgG dương tính và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue thứ phát.
- Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgG và vùng chứng → Kháng thể IgG dương tính và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue thứ phát.

*** Âm tính:** Vạch màu hồng chỉ xuất hiện ở vùng chứng → Không phát hiện được kháng thể IgM và IgG kháng dengue. Kiểm tra lại sau 3 - 4 ngày nếu nghi ngờ có nhiễm virus dengue.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi: Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

328. Dengue virus NS1Ag miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên NS1 của virus Dengue trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương của người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng nguyên NS1 dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Rửa các giếng 1 lần bằng dung dịch rửa đã pha loãng.
7	Cho chứng và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của qui trình.
8	Đậy tấm và ủ.
9	Rửa phiến nhựa.
10	Chuẩn bị chất cộng hợp
11	Đậy tấm và ủ
12	Rửa phiến nhựa
13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ phiến nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng
15	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
16	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Chứng ngưỡng: $OD > 0,2$.
- Chứng âm: Tỷ số OD chứng âm/ OD chứng ngưỡng $< 0,4$.
- Chứng dương: Tỷ số OD chứng dương/ OD chứng ngưỡng $> 1,5$

- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Tính giá trị ngưỡng:

Cut-off (CO) = Giá trị trung bình của các cut-off

- Tính tỷ số mẫu:

Tỷ số mẫu = giá trị OD của mẫu/OD của ngưỡng

Nhận định kết quả:

- Dương tính: khi tỷ số mẫu > 1
- Nghi ngờ: nếu $0,5 \leq \text{tỷ số mẫu} < 1 \rightarrow$ cần xét nghiệm lại.
- Âm tính: khi tỷ số mẫu $< 0,5$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

329. Dengue virus IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgM đặc hiệu kháng virus dengue dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Pha loãng kháng nguyên
5	Pha loãng huyết thanh bệnh nhân, chứng âm, chứng dương và chứng cut-off
6	Trộn đều lượng kháng nguyên đã được pha loãng với một lượng tương đương Mab Tracer. Phức hợp Antigen - Mab Tracer để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ
7	Cho chứng âm, chứng dương, chứng cut-off và bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng của phiến nhựa theo thứ tự hướng dẫn của qui trình
8	Đậy phiến nhựa và ủ
9	Rửa phiến nhựa
10	Lắc nhẹ phức hợp Antigen - Mab Tracer . Nhỏ phức hợp này vào mỗi giếng
11	Đậy phiến nhựa và ủ
12	Rửa phiến nhựa
13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ phiến nhựa, không đậy và tránh ánh sáng
15	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng.
16	Đọc độ kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Tính giá trị trung bình của ngưỡng (calibrator) rồi nhân với yếu tố ngưỡng (calibration factor = 0,62). Đây chính là giá trị ngưỡng:

$$CO = 0,62 \times \frac{ODCO1 + ODCO2 + ODCO3}{3}$$

$$Kết\ quả\ mẫu = 10 \times \frac{OD\ bệnh\ phẩm}{OD\ giá\ trị\ ngưỡng}$$

Nhận định kết quả:

- Kết quả mẫu < 9: mẫu thử âm tính, trong huyết thanh không có kháng thể IgM.
- Kết quả mẫu = 9 - 11: mẫu thử phải xét nghiệm lại
- Kết quả mẫu > 11: mẫu thử dương tính, trong huyết thanh bệnh nhân có kháng thể IgM.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

330. Dengue virus IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng virus dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgG đặc hiệu kháng virus dengue dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Pha loãng kháng nguyên
5	Pha loãng huyết thanh bệnh nhân, chứng âm, chứng dương và chứng cut-off
6	Trộn đều lượng kháng nguyên đã được pha loãng với một lượng tương đương Mab Tracer. Phức hợp Antigen - Mab Tracer để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ
7	Cho chứng âm, chứng dương, chứng cut-off và bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng của phiến nhựa theo thứ tự hướng dẫn của qui trình
8	Đậy phiến nhựa và ủ
9	Rửa phiến nhựa.
10	Lắc nhẹ phức hợp Antigen - Mab Tracer . Nhỏ phức hợp này vào mỗi giếng
11	Đậy phiến nhựa và ủ
12	Rửa phiến nhựa
13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ phiến nhựa, không đậy và tránh ánh sáng
15	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng.
16	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm. trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (cut-off)

$$\overline{OD\ CO} = \frac{ODCO1 + ODCO2 + ODCO3}{3}$$

$$\text{Đơn vị Pan Bio} = 10 \times \frac{\overline{OD\ \text{bệnh phẩm}}}{\overline{OD\ \text{giá trị ngưỡng}}}$$

Nhận định kết quả:

- Kết quả mẫu < 18: mẫu thử âm tính, trong huyết thanh không có kháng thể IgM.
- Kết quả mẫu = 18 - 22: mẫu thử phải xét nghiệm lại lần 2
- Kết quả mẫu > 22: mẫu thử dương tính, trong huyết thanh bệnh nhân có kháng thể IgM.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

331. Dengue virus PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của virus dengue trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của Dengue virus được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR, sau đó khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi xuôi/ngược đặc hiệu. Sự có mặt của Dengue virus được xác định bằng cách so sánh kích thước sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương, dịch cơ thể
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 480 phút (8 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng virus dengue chuẩn hoặc chủng dengue đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng RT-PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit OneStep RT-PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master Mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết RNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm RNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	55	30 phút	1
2	95	5 phút	1
3	95	20 giây	35
	55	30 giây	
	72	1 phút	
4	72	15 phút	1
	4	Bảo quản	

C. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.

- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả qua trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

332. Dengue virus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện RNA đặc trưng của virus Dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật Real-time PCR .

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định sự có mặt của gen đặc trưng sử dụng các cặp mồi và probe cho virus Dengue bằng kỹ thuật Real-time RT- PCR

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương, máu toàn phần, nước tiểu, mô sinh thiết (kích thước tối thiểu 1 x 1 x 1 mm).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết RNA tổng số

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Thực hiện Real-time RT-PCR

- Thực hiện bước này với các tube qPCR mix được giữ trong khay giữ lạnh hoặc trên đá vảy.
- Chỉ lấy đủ số tube qPCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng qPCR phải spin down nhanh tube qPCR để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube
- Chuẩn bị các thành phần của phản ứng Real-time RT-PCR
- Thêm 5 µl của mẫu RNA, chứng dương hoặc chứng âm vào từng tube qPCR đã gồm đầy đủ các thành phần.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR
- Cài đặt vị trí mẫu trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

- Phân tích mẫu

Đọc kết quả ở bước sóng 530 (kênh màu FAM)

Các trường hợp	Chu kỳ (Ct)	Nhận định kết quả
----------------	-------------	-------------------

1	Không tín hiệu	Dưới giới hạn phát hiện hoặc âm tính
2	Tín hiệu xuất hiện < 38 chu kỳ	Dương tính
3	Tín hiệu xuất hiện trong khoảng 38-45 chu kỳ	Chạy lại, nếu vẫn 38-45c, kết quả là Dưới giới hạn phát hiện.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

- + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

333. Dengue virus serotype PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các serotype của virus dengue trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của các serotype Dengue virus được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR, sau đó khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi xuôi/ngược đặc hiệu. Sự có mặt của các serotype dengue virus được xác định bằng cách so sánh kích thước sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương, huyết thanh, dịch cơ thể
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng bốn chủng dengue virus chuẩn có serotype 1, 2, 3, 4 hoặc bốn chủng dengue virus có serotype 1, 2, 3, 4 đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 6$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 6 loại chứng bao gồm: Chứng dương gồm 4 loại serotype để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng RT-PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit OneStep RT-PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master Mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi (Serotype 1, 2, 3, 4)	1.0
4	Môi ngược (Serotype 1, 2, 3, 4)	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết RNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm RNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	55	30 phút	
2	95	5 phút	1
3	95	20 giây	35
	55	30 giây	
	72	1 phút	
4	72	15 phút	1
5	4	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.

- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

334. CMV IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng Cytomegalovirus trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật ELISA .

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính Phát hiện kháng thể IgM kháng Cytomegalovirus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 4 giờ.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Chuẩn bị phức hợp miễn dịch
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Pha loãng bệnh phẩm
7	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
8	Đậy tấm và ủ ở 37°C trong 45 phút
9	Rửa phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình.
10	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
11	Đậy tấm và ủ ở 37°C trong 45 phút
12	Rửa phiến nhựa
13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
15	Dừng phản ứng.
16	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- OD của giếng trống ≤ 0.150 .
- OD của mỗi cut-off luôn luôn trong khoảng 25% giá trị trung bình cut-off. Loại bỏ những giá trị không nằm trong khoảng này và tính toán lại giá trị trung bình.

- OD của chứng dương $\geq 1,5 \times \text{OD cut-off}$
- Tỷ lệ OD chứng âm : OD cut-off < 0.6 .
- OD cut-off ≥ 0.16 .

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Nếu OD của mẫu bệnh phẩm $> \text{OD của cut-off}$: mẫu bệnh phẩm dương tính với CMV-IgM.
- Tính toán tỷ lệ giữa giá trị OD mẫu và OD cut-off.
 - + Dương tính: nếu tỷ lệ > 1.2
 - + Nghi ngờ: nếu tỷ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 20% OD của cut-off
 - + Âm tính: nếu tỷ lệ < 0.8
- Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ $\rightarrow$ yêu cầu lấy mẫu huyết thanh mới sau 2 – 3 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.

- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

335. CMV IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng Cytomegalovirus trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật ELISA .

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính phát hiện kháng thể IgG kháng Cytomegalovirus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
5	Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:101
6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
7	Đậy tấm và ủ
8	Rửa phiến nhựa.
9	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
10	Đậy tấm và ủ
11	Rửa phiến nhựa
12	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
14	Dừng phản ứng.
15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm. trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- OD của giếng trống ≤ 0.150 .

- OD của mỗi cut-off luôn luôn trong khoảng 25% giá trị trung bình cut-off. Loại bỏ những giá trị không nằm trong khoảng này và tính toán lại giá trị trung bình.
- OD của chứng dương $\geq 1,5 \times \text{OD cut-off}$
- Tỷ lệ OD chứng âm : OD cut-off < 0.6 .
- OD cut-off ≥ 0.16 . OD của chứng âm < 0.6
- OD của calibrator 2 ≥ 0.16
- OD của calibrator 5 $\geq 1,2$
- OD của giếng trống $\leq 0,15$
- Tỷ lệ OD chứng âm : OD cut-off < 0.6 .
- OD cut-off ≥ 0.16 .
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Tính tỷ lệ giữa OD của mẫu bệnh phẩm : OD của calibrator 2
 - + Dương tính: nếu tỷ lệ > 1.2
 - + Nghi ngờ: nếu $0,8 \leq \text{tỷ lệ} \leq 1.2$
 - + Âm tính: nếu tỷ lệ < 0.8

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

336. CMV IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng Cytomegalovirus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định nồng độ kháng thể IgM kháng Cytomegalovirus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút (1 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy. Chuẩn bị các hóa chất kèm theo.
2	Kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không.
3	Chạy chứng (Tham khảo qui trình chạy chứng...)
	Chạy mẫu theo các bước sau
4	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
	Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 5-12
5	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm.
6	Hút huyết thanh/huyết tương vào cốc đựng mẫu tương ứng.
7	Vào màn hình thao tác theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
9	Chọn test CMV IgG
10	Nhập số rack và vị trí mẫu
11	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần xét nghiệm (hoặc cốc chứa mẫu bệnh phẩm) lên Rack đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
12	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất
	Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 13-15:
13	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Quản lý thông tin phòng xét nghiệm
14	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack quy định, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
15	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Âm tính: Nếu $COI < 0,7$
- Nghi ngờ: Nếu $0,7 \leq COI < 1.0$
- Dương tính: Nếu $COI \geq 1.0$
- Những mẫu nghi ngờ cần kiểm tra lại lần 2. Nếu vẫn lặp lại kết quả lần đầu thì nên xét nghiệm lại với mẫu bệnh phẩm thứ hai sau 2 - 3 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

337. CMV IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng Cytomegalovirus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định nồng độ kháng thể IgG kháng Cytomegalovirus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy. Chuẩn bị các hóa chất kèm theo.
2	Kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không.
3	Chạy chứng (Tham khảo qui trình chạy chứng...)
	Chạy mẫu theo các bước sau
4	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
	Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 5-12
5	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm.
6	Hút huyết thanh/huyết tương vào cốc đựng mẫu tương ứng.
7	Vào màn hình thao tác theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
9	Chọn test CMV IgG
10	Nhập số rack và vị trí mẫu
11	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần xét nghiệm (hoặc cốc chứa mẫu bệnh phẩm) lên Rack đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
12	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất
	Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 13-15:
13	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Quản lý thông tin phòng xét nghiệm
14	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack quy định, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
15	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Âm tính: Nếu $COI < 0,5$ U/ml
- Nghi ngờ: Nếu $0,5 \leq COI < 1.0$ U/ml → Kiểm tra lại. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì 2 tuần sau lấy một mẫu bệnh phẩm mới để xét nghiệm lại.
- Dương tính: Nếu $COI \geq 1.0$ U/ml
- Dải định lượng: 0,25 - 500 U/ml
- Ngưỡng phát hiện: 0,25 U/ml
- Những mẫu có giá trị lớn hơn dải định lượng thì máy sẽ báo > 500 U/ml hoặc > 1000 U/ml đối với mẫu pha loãng 1:20
- Những mẫu có giá trị lớn hơn dải định lượng thì pha loãng mẫu với tỷ lệ 1:20.
 - + Nếu pha loãng bằng tay:
 Kết quả cuối cùng (U/ml) = giá trị đo được x độ pha loãng (20)
 - + Nếu pha loãng trên máy: Máy sẽ tự động tính toán kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

338. CMV đo tải lượng hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và định lượng DNA Cytomegalovirus trong huyết tương người chống đông bằng EDTA trên hệ thống máy PCR tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR và chuẩn bị mẫu, tách chiết và tinh sạch acid nucleic sau đó khuếch đại và phát hiện bằng PCR hoàn toàn tự động. Hỗn hợp phản ứng PCR của CMV chứa một mẫu dò phát hiện đặc hiệu cho trình tự đích CMV và một cho chứng nội chuẩn DNA-QS (Deoxyribonucleic acid - Quantitation Standard). Các mẫu dò được đánh dấu với các nhóm phát huỳnh quang đặc hiệu với đích cho phép phát hiện đồng thời CMV đích và DNA-QS trong hai kênh đích khác nhau. Với mỗi chu kỳ PCR, số lượng của mẫu dò đã phân cắt được tạo ra càng tăng và tín hiệu tích lũy của nhóm phát huỳnh quang đồng thời tăng. Việc phát hiện tín hiệu theo thời gian thực và phân biệt các sản phẩm PCR được thực hiện bằng cách đo huỳnh quang của các nhóm phát huỳnh quang giải phóng tương ứng cho tín hiệu gen đích và DNA-QS.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C hoặc -70°C)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương từ máu chống đông bằng EDTA.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

1	Đăng nhập hệ thống
2	Nạp mẫu lên hệ thống • Nạp giá mẫu thử lên hệ thống • Hệ thống tự động chuẩn bị • Tạo lệnh xét nghiệm
3	Thêm thuốc thử và vật tư tiêu hao theo yêu cầu của hệ thống • Nạp đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm • Nạp giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) • Nạp các đầu tip xử lý • Nạp các đầu tip rửa giải • Nạp các đĩa xử lý • Nạp các đĩa chất thải lỏng • Nạp các đĩa khuếch đại • Nạp hộp cassette MGP • Thêm chất pha loãng mẫu • Thêm thuốc thử ly giải • Thêm đệm rửa
4	Bắt đầu chạy xét nghiệm bằng cách chọn nút Start processing trên giao diện người sử dụng, tất cả các mẻ chạy sau đó sẽ được tự động bắt đầu nếu không bị hoãn thủ công bởi người sử dụng.
5	Kiểm tra và xuất kết quả
6	Lấy ra và đặt nắp bất kỳ ống mẫu nào đáp ứng yêu cầu thể tích tối thiểu để sử dụng thêm nếu cần Vệ sinh thiết bị • Lấy giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) đã hết ra khỏi máy • Lấy đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm đã hết ra khỏi máy • Dọn khay đựng các đĩa khuếch đại • Đổ bỏ chất thải lỏng • Đổ bỏ chất thải rắn

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

a. Đánh giá theo yêu cầu của nhà sản xuất

- Mẫu chứng được hiển thị “Valid” ở cột “Control result” nếu tất cả các đích của mẫu chứng được báo cáo là hợp lệ. Mẫu chứng được hiển thị “Invalid” ở cột “Control result” nếu tất cả hoặc một trong các đích của mẫu chứng được báo cáo là không hợp lệ.
- Mẫu chứng được hiển thị ‘Invalid’ sẽ xuất hiện cờ hiệu ở cột “Flags”. Thông tin thêm về lý do mẫu chứng được báo cáo là không hợp lệ, bao gồm cả thông tin cờ hiệu được hiển thị trong chế độ xem thông tin chi tiết.

- Nếu một trong các mẫu chứng dương tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các mẫu chứng dương tính và mẫu thử có liên quan. Nếu mẫu chứng âm tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các mẫu chứng và mẫu thử có liên quan.

d. Đánh giá theo yêu cầu phòng xét nghiệm

- Đánh giá QC (NC, LPC, HPC) theo hướng dẫn theo dõi QC của phòng xét nghiệm.

4.2.2. Đọc kết quả:

e. Đọc kết quả của mẫu chứng trong ứng dụng “Controls”.

- Valid: nếu tất cả kết quả được báo cáo hợp lệ
- Invalid: nếu tất cả kết quả được báo cáo là không hợp lệ
 - + Mẫu chứng được hiển thị ‘Invalid’ sẽ xuất hiện cờ hiệu ở cột “Flags”. Thông tin thêm về lý do mẫu chứng được báo cáo là không hợp lệ, bao gồm cả thông tin cờ hiệu được hiển thị trong chế độ xem thông tin chi tiết.
 - + Nếu một trong các mẫu chứng dương tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các mẫu chứng dương tính và mẫu thử có liên quan.
 - + Nếu mẫu chứng âm tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các chứng và mẫu thử có liên quan.

f. Đọc kết quả của mẫu bệnh phẩm

Một mẻ xét nghiệm hợp lệ có thể bao gồm kết quả mẫu hợp lệ và không hợp lệ.

Kết quả định lượng CMV DNA của máy được tính theo Đơn vị số IU/ml.

Kết quả	Biện luận
Không phát hiện đích	Không phát hiện DNA CMV Báo cáo kết quả là “không phát hiện CMV”.
< Nồng độ tối thiểu	Nồng độ tính nằm dưới giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của xét nghiệm. Báo cáo kết quả là “Phát hiện CMV, thấp hơn (Nồng độ tối thiểu).” Nồng độ tối thiểu = 34.5 IU/mL
Nồng độ	Nồng độ tính nằm trong khoảng tuyến tính của xét nghiệm - lớn hơn hoặc bằng Nồng độ tối thiểu và nhỏ hơn hoặc bằng Nồng độ tối đa. Báo cáo kết quả là “Phát hiện (Nồng độ) của CMV”.
> Nồng độ tối đa ^a	Nồng độ tính nằm trên giới hạn định lượng trên (ULOQ) của xét nghiệm. Báo cáo kết quả là “Phát hiện CMV, cao hơn (Nồng độ tối đa)”.

a Kết quả mẫu > Nồng độ tối đa là do những mẫu dương tính với CMV được phát hiện với nồng độ nằm trên giới hạn định lượng trên (ULOQ). Nếu muốn thu được kết quả định lượng, mẫu gốc nên được pha loãng với huyết tương người chống đông bằng EDTA âm tính với CMV và cần phải lặp lại xét nghiệm. Nhân kết quả thu được với hệ số pha loãng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kết quả có thể âm tính giả trong các trường hợp sau:
 - + Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng: heparin
 - + Môi trường:
 - Sử dụng quá nhiều a-xít hypochlorous trong khử nhiễm phòng thí nghiệm.
 - Sử dụng găng có bột talc khi thực hiện xét nghiệm.
- Kết quả có thể dương tính giả trong các trường hợp sau:
 - + Có sự lây nhiễm chéo giữa các mẫu bệnh phẩm.
 - + Lây nhiễm các sản phẩm khuyếch đại từ lần phản ứng trước.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

339. CMV Avidity

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định ái tính của các kháng thể IgG kháng Cytomegalovirus trong huyết thanh và huyết tương.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng Cytomegalovirus bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang (CLIA) để xác định ái tính của các kháng thể IgG kháng Cytomegalovirus

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đề tối ưu hiệu năng XN nên tuân theo tờ hướng dẫn kèm theo bộ thuốc thử
3	Tham khảo hướng dẫn vận hành cho từng XN đặc hiệu tương ứng
4	Thiết bị tự động trộn các vi hạt trước khi sử dụng
5	Máy đọc thông số đặc hiệu của XN trên mã vạch của thuốc thử, trong trường hợp ngoại lệ nếu máy không đọc được mã vạch hãy nhập chuỗi 15 con số vào
6	Đưa thuốc thử đang lạnh về nhiệt độ 20 ⁰ C và đặt vào khay thuốc thử trên máy phân tích, tránh tạo bọt, hệ thống sẽ tự động điều hòa nhiệt độ của thuốc thử và tự động đóng/mở nắp chai
7	Đặt mẫu chuẩn hoàn nguyên lên vùng đặt mẫu, máy phân tích tự động ghi nhận tất cả thông tin cần thiết cho việc chuẩn XN, sau khi hoàn thành chuẩn, lưu trữ cal1 và cal2 ở 2 ⁰ C - 8 ⁰ C hoặc loại bỏ chúng
8	Kiểm tra chất lượng: sử dụng Precicontrol CMV IgG Avidity, chạy các mẫu chứng với nồng độ khác nhau ít nhất 1 lần cho mỗi 24 giờ khi XN vẫn đang sử dụng và sau mỗi lần chuẩn định

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Máy phân tích tự động tính toán nồng độ chất phân tích trong mỗi mẫu đo dưới dạng U/ml
- Ái tính (Avi%) phải được tính toán thủ công:

$$\text{Avi}\% = (\text{kết quả đo xử lý DiLCMVAv (U/ml)} / \text{kết quả đo chứng (U/ml)}) \times 100\%$$

Chỉ những mẫu cho phản ứng ở đo chứng (≥ 1.0 U/ml) có thể dùng để xác định ái tính (Avi%)

Nếu kết quả đo xử lý DiLCMVAv cho giá trị < 0.3 U/ml hãy tính toán ái tính (Avi%) với 0.3 U/ml

Kết quả thu được với XN Elecsys CMV IgG Avidity được diễn giải như sau:

Ái tính	Diễn giải kết quả
< 45.0 Avi%	Ái tính thấp
$45.0-54.9$ Avi%	Vùng xám
≥ 55.0 Avi%	Ái tính cao

- Nếu kết quả vùng xám, khuyến cáo lấy lại mẫu trong khoảng thời gian thích hợp (khoảng 2-4 tuần sau) → làm lại xét nghiệm.
- Các kết quả Elecsys CMV Avidity nên được sử dụng kết hợp với bệnh sử, thăm khám lâm sàng và các kết quả XN khác như CMV IgG, CMV IgM đặc hiệu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

340. Rubella virus Avidity

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định ái tính cao và thấp của kháng thể IgG kháng virus Rubella trong huyết thanh người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính Phát hiện kháng thể IgG kháng virus Rubella dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 180 phút (3 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Xử lý trước mẫu với chất hấp thụ yếu tố dạng thấp (RF) trước khi phát hiện IgM.
7	Cho chứng (1 giếng trống, 2 giếng chứng dương) và 2 giếng bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình.
8	Đậy tấm và ủ 60 phút ở 37°C.
9	Rửa phiến nhựa.
10	Nhỏ dung dịch rửa vào 1 giếng bệnh phẩm và 1 giếng chứng. Các giếng còn lại nhỏ dung dịch đệm Avidity Bufer vào các giếng còn lại. Chuẩn bị chất cộng hợp
11	Đậy tấm và ủ 10 phút ở 37°C
12	Rửa phiến nhựa
13	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào mỗi giếng
14	Đậy tấm và ủ 45 phút ở 37°C.
15	Rửa phiến nhựa.
16	Nhỏ dung dịch hiện màu.
17	Ủ ở nhiệt độ phòng, không đậy tấm và tránh ánh sáng
18	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620 nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- OD giếng chứng ủ với dung dịch rửa phải > 0.500 .
- Phần trăm ái tính của giếng chứng ủ với dung dịch đệm phải cao hơn 45 % so với giếng chứng ủ với dung dịch rửa.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Phần trăm ái tính của mẫu bệnh phẩm được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ Avidity} = \frac{\text{OD giếng chứng ủ với dung dịch đệm} - \text{OD giếng trống}}{\text{OD giếng chứng ủ với dung dịch rửa} - \text{OD giếng trống}} \times 100$$

- Nếu tỷ số % Avidity $> 45 \%$: có sự xuất hiện kháng thể IgG ái tính cao.
- Nếu tỷ số % Avidity $< 35 \%$: có sự xuất hiện kháng thể IgG ái tính thấp.
- Nếu tỷ số $35 \% \leq \% \text{ Avidity} \leq 45 \%$: có sự xuất hiện kháng thể IgG ái tính trung bình (vùng ranh giới cần chú ý)
- Chỉ cần tính tỷ số này ở những giếng bệnh phẩm ủ với dung dịch rửa có OD $> 0,440$. Nếu OD $< 0,4$ thì cần xét nghiệm lặp lại với mẫu bệnh phẩm pha loãng 1:101.
- Những mẫu có tỷ số ái tính ở mức trung bình cần lặp lại xét nghiệm. Những mẫu này cũng nên được kiểm tra lại sau 2 – 3 tuần để đánh giá lại sự biến đổi của tỷ số % ái tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ

kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

341. *Toxoplasma* Avidity

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định ái tính của các kháng thể IgG kháng *T. gondii* trong huyết thanh và huyết tương người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng *T. gondii* bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang (ECLIA) để xác định ái tính của các kháng thể IgG kháng *T. Gondii*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy lý tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đề tối ưu hiệu năng XN nên tuân theo tờ hướng dẫn kèm theo bộ thuốc thử
3	Tham khảo hướng dẫn vận hành cho từng XN đặc hiệu tương ứng
4	Thiết bị tự động trộn các vi hạt trước khi sử dụng
5	Máy đọc thông số đặc hiệu của XN trên mã vạch của thuốc thử, trong trường hợp ngoại lệ nếu máy không đọc được mã vạch hãy nhập chuỗi 15 con số vào
6	Thuốc thử dạng pha sẵn để sử dụng và được đựng trong lọ tương thích với hệ thống
7	Đưa thuốc thử đang lạnh về nhiệt độ 20 ⁰ C và đặt vào khay thuốc thử trên máy phân tích, tránh tạo bọt, hệ thống sẽ tự động điều hòa nhiệt độ của thuốc thử và tự động đóng/mở nắp chai
8	Đặt mẫu chuẩn hoàn nguyên lên vùng đặt mẫu, máy phân tích tự động ghi nhận tất cả thông tin cần thiết cho việc chuẩn XN, sau khi hoàn thành chuẩn, lưu trữ cal1 và cal2 ở 2 ⁰ C -8 ⁰ C hoặc loại bỏ chúng
9	Chạy các mẫu chứng với nồng độ khác nhau tối thiểu 1 lần cho mỗi 24 giờ khi XN vẫn đang sử dụng, một lần với mỗi hộp thuốc thử và sau mỗi lần chuẩn, kết quả mẫu chứng phải nằm trong thang
10	Trước khi đo ái tính, nồng độ mẫu phải được xác định bằng XN Toxo IgG
11	Các mẫu phản ứng khi sử dụng XN Toxo IgG có nồng độ 6-500 IU/mL được tách vào 2 aliquot
12	Nếu mẫu phản ứng khi sử dụng XN Toxo IgG có nồng độ > 500 IU/mL thì mẫu phải được pha loãng thủ công bằng Diluent Universal trước khi tách vào 2 aliquot.
13	Kiểm tra chất lượng: sử dụng chứng Toxo IgG Avidity, chạy các mẫu chứng với nồng độ khác nhau ít nhất 1 lần cho mỗi 24 giờ khi XN vẫn đang sử dụng và sau mỗi lần chuẩn định.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Máy phân tích tự động tính toán nồng độ chất phân tích trong mỗi mẫu đo dưới dạng U/ml
- Ái tính (Avi%) được tính toán theo công thức:

$$\text{Avi}\% = 100 - \left[\frac{\text{IU/ml của aliquot xử lý với DilToxoAv}}{\text{IU/ml của aliquot xử lý với DilUni}} \times 100\% \right]$$

Chú ý:

- + Nếu mẫu pha loãng bằng DilUni có nồng độ < 3 IU/mL (kết quả không xác định) thì không thể tính toán ái tính.
- + Nếu mẫu pha loãng bằng DilToxoAv có nồng độ < 0.130 IU/mL (< giới hạn phát hiện thấp hơn) thì không thể tính toán ái tính.

Kết quả thu được với XN Toxo IgG Avidity được diễn giải như sau:

Ái tính	Diễn giải kết quả
< 70	Ái tính thấp
70 - 79	Vùng xám
≥ 80	Ái tính cao

- Nếu kết quả vùng xám, khuyến cáo lấy lại mẫu trong khoảng thời gian thích hợp (khoảng 2-4 tuần sau) → làm lại xét nghiệm.
- Các kết quả Toxo IgG Avidity nên được sử dụng kết hợp với bệnh sử, thăm khám lâm sàng và các kết quả XN khác như Toxo IgG, Toxo IgM đặc hiệu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

342. HSV 1+2 IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng Herpes virus typ 1 và typ 2 trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgM kháng Herpes virus typ 1 và typ 2 dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Chuẩn bị phức hợp miễn dịch
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
7	Đậy tấm và ủ
8	Rửa phiên nhựa.
9	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
10	Đậy tấm và ủ
11	Rửa phiên nhựa.
12	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
14	Dùng phản ứng.
15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm, trong vòng 30 phút sau khi dùng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- OD của giếng trống ≤ 0.150 .
- OD của mỗi cut-off luôn luôn trong khoảng 25% giá trị trung bình cut-off. Loại bỏ những giá trị không nằm trong khoảng này và tính toán lại giá trị trung bình.

- OD của chứng dương $\geq 1,5 \times \text{OD cut-off}$
- Tỷ lệ OD chứng âm : OD cut-off < 0.6 .
- OD cut-off ≥ 0.16 .

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Nếu OD của mẫu bệnh phẩm $> \text{OD của cut-off}$: mẫu bệnh phẩm dương tính với HSV-IgM.
- Tính toán tỷ lệ giữa giá trị OD mẫu và OD cut-off.
 - + Dương tính: nếu tỷ lệ > 1.2
 - + Nghi ngờ: nếu tỷ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 20% OD của cut-off
 - + Âm tính: nếu tỷ lệ < 0.8
- Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ $\rightarrow$ yêu cầu lấy mẫu huyết thanh mới sau 2 – 3 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.

- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

343. HSV 1+2 IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng Herpes virus typ 1 và typ 2 trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgG kháng herpes virus typ 1 và typ 2 dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Chuẩn bị phức hợp miễn dịch
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
7	Đậy tấm và ủ
8	Rửa phiên nhựa.
9	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
10	Đậy tấm và ủ
11	Rửa phiên nhựa.
12	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
14	Dùng phản ứng.
15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm, trong vòng 30 phút sau khi dùng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- OD của giếng trống ≤ 0.150 .
- OD của mỗi cut-off luôn luôn trong khoảng 25% giá trị trung bình cut-off. Loại bỏ những giá trị không nằm trong khoảng này và tính toán lại giá trị trung bình.

- OD của chứng dương $\geq 1,5 \times \text{OD cut-off}$
- Tỷ lệ OD chứng âm : OD cut-off < 0.6 .
- OD cut-off ≥ 0.16 .

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Nếu OD của mẫu bệnh phẩm $> \text{OD của cut-off}$: mẫu bệnh phẩm dương tính với HSV-IgG.
- Tính toán tỷ lệ giữa giá trị OD mẫu và OD cut-off.
 - + Dương tính: nếu tỷ lệ > 1.2
 - + Nghi ngờ: nếu tỷ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 20% OD của cut-off
 - + Âm tính: nếu tỷ lệ < 0.8
- Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ $\rightarrow$ yêu cầu lấy mẫu huyết thanh mới sau 2 – 3 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.

- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

344. HSV 1 IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Tài liệu này hướng dẫn thực hiện quy trình xét nghiệm để phát hiện định tính kháng thể lớp IgG kháng HSV-1 trong huyết thanh và huyết tương người bằng kỹ thuật ECLIA (miễn dịch điện hóa phát quang).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ECLIA (miễn dịch điện hóa phát quang). Dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KKT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

Định nghĩa:

- HSV: Herpes Simplex virus
- HSV 1 IgG: kháng thể lớp IgG kháng HSV-1.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HSV 1 IgG (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư tiêu hao, vật tư thay thế
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Nắp nhôm đậy ống nghiệm
- Đầu côn 200 μ L - tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L - tiết trùng

- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 10 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Dụng cụ lấy mẫu theo hướng dẫn ở sổ tay lấy mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy miễn dịch tự động
- Máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Hệ thống lọc nước khử ion
- Máy ly tâm thường
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 µl, 200 µl và 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khẩn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm HSV 1 IgG (VD hoặc tương đương)

Các bước	Xét nghiệm định tính HSV 1 IgG
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Kiểm tra tình trạng hiệu chuẩn của máy. Hiệu chuẩn máy khi có yêu cầu.
3	Chạy chứng HSV bao gồm 2 mức: chứng âm và chứng dương theo hướng dẫn nhà sản xuất. Đánh giá kết quả QC đạt, tiến hành chạy mẫu bệnh phẩm
4	Chạy mẫu theo các bước sau:
5	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước sau	
6	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
7	Vào màn hình Workplace → Test Selection
8	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
9	Chọn tên test là HSV 1 IgG
10	Vào Barcode

11	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
12	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
13	Start → Chọn START
Nếu chạy mẫu có barcode thì bỏ các bước từ 6-13 và tiến hành như sau:	
14	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm của phòng xét nghiệm.
	Tiếp tục quay lại bước 12 và 13

4.2. Nhận định kết quả

Máy xét nghiệm tự động tính toán dựa trên các đường chuẩn. Tham khảo hướng dẫn sử dụng thiết bị để biết thông tin chi tiết.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng. Kết quả nên được diễn giải như sau:

- $COI < 0,6$: Âm tính đối với kháng thể IgG đặc hiệu kháng HSV-1 và không cần xét nghiệm thêm.
- $0,6 \leq COI < 1$: được xem là mẫu thuộc vùng xám. Các mẫu này phải được xét nghiệm lại. Trong trường hợp kết quả vẫn nằm trong vùng xám, nên xét nghiệm mẫu thứ hai, ví dụ trong vòng 2-3 tuần tiếp theo. Kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định
- $COI \geq 1$: được xem là mẫu có phản ứng trong xét nghiệm Elecsys HSV-1 IgG → xét nghiệm kháng thể HSV-1 IgG dương tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

345. HSV 2 IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG của virus HSV 2 trong mẫu bệnh phẩm huyết thanh hoặc huyết tương người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý điện hóa phát quang để phát hiện kháng thể IgG của virus HSV 2

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy. Chuẩn bị các hóa chất kèm theo.
2	Kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không.
3	Chạy chứng (Tham khảo qui trình chạy chứng...)
	Chạy mẫu theo các bước sau
4	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
	Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 5-12
5	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm.
6	Hút huyết thanh/huyết tương vào cốc đựng mẫu tương ứng.
7	Vào màn hình thao tác theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm
9	Chọn test HSV 2 IgG
10	Nhập số rack và vị trí mẫu
11	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần xét nghiệm (hoặc cốc chứa mẫu bệnh phẩm) lên Rack đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
12	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất
	Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 13-15:
13	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm
14	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack quy định, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
15	Thao tác chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chạy kiểm tra chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.
- Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Nhận định kết quả qua phân tích của máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Những mẫu nghi ngờ cần kiểm tra lại lần 2. Nếu vẫn lặp lại kết quả lần đầu thì nên xét nghiệm lại với mẫu bệnh phẩm thứ hai sau 15-20 ngày.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

346. HSV 1 + 2 IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm phát hiện định tính kháng thể IgM đặc hiệu với virus Herpes simplex týp 1 và/hoặc týp 2 (HSV-1 và/hoặc HSV-2) trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của công nghệ miễn dịch hóa phát quang (CLIA). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ chất phát quang gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua tín hiệu ánh sáng được đo bởi bộ phận nhân quang.

Định nghĩa: HSV 1 + 2: Herpes simplex Virus týp 1 và 2.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm HSV - 1/2 IgM miễn dịch tự động (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 10 ml
- Panh

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm HSV-1/2 IgM, miễn dịch tự động (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đặt khay thuốc thử tích hợp vào khoang thuốc thử của máy phân tích với nhãn mã vạch ở bên trái và để yên trong 30 phút trước khi sử dụng. Máy phân tích tự động khuấy và phân tán hoàn toàn hạt từ.
2	Tuân thủ Hướng dẫn sử dụng của máy phân tích để nạp mẫu và bắt đầu chạy.
3	Chuẩn và chứng thực hiện theo quy trình hướng dẫn. Hiệu chuẩn lặp lại 3 lần khi có ít nhất một trong các điều kiện sau: - Sử dụng lô thuốc thử tích hợp hoặc lô cơ chất mới. - 8 tuần kể từ lần hiệu chuẩn trước đó. - Máy xét nghiệm vừa được bảo dưỡng. - Giá trị kiểm chứng nằm ngoài dải kỳ vọng.
4	Pha loãng mẫu theo hướng dẫn nhà sản xuất
5	Phân phối chất hiệu chuẩn/ chất kiểm chứng/ mẫu bệnh phẩm vào mô-đun phản ứng.
6	Phân phối đệm theo hướng dẫn nhà sản xuất.
7	Phân phối hạt từ.
8	Ủ.
9	Rửa với Wash/System Liquid theo hướng dẫn nhà sản xuất.
10	Phân phối chất cộng hợp vào mô-đun phản ứng.
11	Ủ.

Các bước	Nội dung
12	Rửa với Wash/System Liquid theo hướng dẫn nhà sản xuất.
13	Thêm cơ chất và đo tín hiệu ánh sáng phát ra.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Khi phân tích chất hiệu chuẩn và chất kiểm chứng trên máy, giá trị RLU hoặc nồng độ thu được có thể khác nhau, tuy nhiên, kết quả xét nghiệm của bệnh nhân trên 2 máy là tương đương.

Giá trị ngưỡng để phân biệt sự có mặt/ không có mặt của kháng thể IgM kháng HSV là 1 (index).

- Mẫu có nồng độ IgM kháng HSV dưới 0,9 (index): Âm tính.
- Mẫu có nồng độ IgM kháng HSV nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,1 (index): nghi ngờ.
- Mẫu có nồng độ IgM kháng HSV lớn hơn hoặc bằng 1,1 (index): Dương tính.

Kết quả dương tính cho biết đang có nhiễm virus. Tuy nhiên, kết quả âm tính không loại trừ khả năng nhiễm HSV cấp tính, vì bệnh nhân có thể chỉ mới nhiễm virus và chưa thể tổng hợp được IgM đặc hiệu với HSV.

Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Mẫu nghi ngờ cần được xét nghiệm lại để xác nhận kết quả ban đầu. Nếu lần xét nghiệm lại cho kết quả dương tính thì kết quả được xem là dương tính. Nếu lần xét nghiệm lại cho kết quả âm tính thì kết quả được xem là âm tính. Nếu lặp lại kết quả nghi ngờ, mẫu lần 2 nên được lấy và xét nghiệm cách mẫu lần 1 tối thiểu 1 tuần.
- Nếu trên lâm sàng vẫn nghi ngờ có phơi nhiễm với HSV dù kết quả xét nghiệm âm tính, tiến hành lấy mẫu và xét nghiệm lần 2 sau ít nhất 1 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Các mẫu nhiễm khuẩn hoặc đã bất hoạt bởi nhiệt có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.

Kháng thể IgM kháng HSV có thể tồn tại trong khoảng thời gian dài và đáp ứng IgM đặc hiệu có thể thu được sau khi tái nhiễm, do tái kích hoạt thể tiềm ẩn, hoặc cả khi mắc các bệnh do virus khác.

Không hoán đổi các khay thuốc thử tích hợp giữa các loại máy xét nghiệm khác nhau.

Có thể có phản ứng chéo cho xét nghiệm HSV-1/2 IgM với nguy cơ gây nhiễu của các kháng thể kháng các loại vi sinh vật có khả năng gây các bệnh truyền nhiễm khác (hCMV, parvovirus B19, *Toxoplasma gondii*, HBV, HAV, *Treponema pallidum*, VZV, virus sởi, virus quai bị, *Borrelia burgdorferi*, các loại virus cúm), nguy cơ gây nhiễu của các yếu tố khác – các yếu tố này có thể bắt nguồn từ hoạt động không điển hình của hệ thống miễn dịch (kháng thể kháng nhân, yếu tố dạng thấp).

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

347. HSV 1 + 2 IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm định tính phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu với virus Herpes simplex týp 1 và/ hoặc týp 2 (HSV-1 và/hoặc HSV-2) trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của công nghệ miễn dịch hóa phát quang (CLIA). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ chất phát quang gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua tín hiệu ánh sáng được đo bởi bộ phận nhân quang.

Định nghĩa: HSV 1 + 2: Herpes simplex Virus týp 1 và 2.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm HSV-1/2 IgG, máy miễn dịch tự động (VD hoặc tương đương).
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 10 ml

- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm HSV-1/2 IgG (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Đặt khay thuốc thử tích hợp vào khoang thuốc thử của máy phân tích với nhãn mã vạch ở bên trái và để yên trong 30 phút trước khi sử dụng. Máy phân tích tự động khuấy và phân tán hoàn toàn hạt từ.
2	Tuân thủ Hướng dẫn sử dụng của máy phân tích.
3	Chuẩn và chứng thực hiện theo quy trình hướng dẫn. Hiệu chuẩn lặp lại 3 lần khi có ít nhất một trong các điều kiện sau: - Sử dụng lô thuốc thử tích hợp hoặc lô cơ chất mới. - 4 tuần kể từ lần hiệu chuẩn trước đó. - Máy xét nghiệm vừa được bảo dưỡng. - Giá trị kiểm chứng nằm ngoài dải kỳ vọng.
4	Phân phối chất hiệu chuẩn/ chất kiểm chứng/ mẫu bệnh phẩm vào mô-đun phản ứng.
5	Phân phối hạt từ.
6	Phân phối đệm theo hướng dẫn nhà sản xuất.
7	Phân phối dung dịch pha loãng mẫu.
8	Ủ.
9	Rửa với Wash/System Liquid theo hướng dẫn nhà sản xuất.
10	Phân phối chất cộng hợp vào mô-đun phản ứng.
11	Ủ.
12	Rửa với Wash/System Liquid theo hướng dẫn nhà sản xuất.
13	Thêm cơ chất phản ứng và đo tín hiệu ánh sáng phát ra.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Đọc kết quả và nhận định kết quả:

- Khi phân tích chất hiệu chuẩn và chất kiểm chứng trên máy, giá trị RLU hoặc nồng độ thu được có thể khác nhau, tuy nhiên, kết quả xét nghiệm của bệnh nhân trên 2 máy là tương đương.
- Giá trị ngưỡng (cut-off) để phân biệt sự có mặt/ vắng mặt của IgG kháng HSV là 1 (index).
 - + Mẫu có nồng độ IgG kháng HSV dưới 0,9 (index): Âm tính.
 - + Mẫu có nồng độ IgG kháng HSV nằm trong khoảng từ 0,9 đến 1,1 (index) : *ngghi ngờ*. Mẫu *ngghi ngờ* cần được xét nghiệm lại để xác nhận kết quả ban đầu. Nếu lần xét nghiệm lại cho kết quả *dương tính* thì kết quả được xem là *dương tính*. Nếu lần xét nghiệm lại cho kết quả *âm tính* thì kết quả được xem là *âm tính*. Nếu lặp lại kết quả *ngghi ngờ*, mẫu lần 2 phải được lấy và xét nghiệm lại cách mẫu lần 1 tối thiểu 1 tuần.
 - + Mẫu có nồng độ IgG kháng HSV lớn hơn hoặc bằng 1,1 (index): *dương tính*.
- Kết quả âm tính thường cho biết bệnh nhân chưa từng nhiễm virus, nhưng không loại trừ khả năng nhiễm HSV cấp tính. Nếu trên lâm sàng nghi ngờ có phơi nhiễm với HSV dù kết quả âm tính, nên tiến hành lấy mẫu và xét nghiệm lần 2 sau đó ít nhất 1 tuần.
- Kết quả dương tính thường cho biết bệnh nhân đã phơi nhiễm với tác nhân gây bệnh, hoặc đã hình thành kháng thể miễn dịch kháng HSV.
- Kết quả xét nghiệm định tính được báo cáo dương tính hoặc âm tính với sự có mặt của IgG kháng HSV. Tuy nhiên, chẩn đoán nhiễm virus không nên chỉ dựa trên một kết quả xét nghiệm duy nhất mà cần kết hợp với các kết quả lâm sàng, quy trình chẩn đoán và các đánh giá y học khác.
- Xét nghiệm HSV-1/2 IgG có ý nghĩa trong đánh giá tình trạng miễn dịch ở người trưởng thành có hoạt động tình dục hoặc phụ nữ mang thai khi nhiễm virus Herpes simplex. Xét nghiệm được sử dụng kết hợp với xét nghiệm HSV-2 IgG để phân biệt các đối tượng nhiễm đơn độc HSV-1 từ các cá thể nhiễm HSV-1 và/hoặc HSV-2, cách thức được mô tả trong bảng dưới đây.

Kết quả HSV-1/2 IgG	Kết quả HSV-2 IgG	Diễn giải
Âm tính	Âm tính	Chưa từng phơi nhiễm với HSV, âm tính với cả HSV-1 IgG và HSV-2 IgG.
Dương tính	Âm tính	Nhiễm HSV-1 đơn độc.
Dương tính	Dương tính	Nhiễm HSV-2 đơn độc hoặc nhiễm cả HSV-1 và HSV-2.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm.

Các mẫu nhiễm khuẩn hoặc đã bất hoạt bởi nhiệt có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.

Không hoán đổi các khay thuốc thử tích hợp giữa các loại máy xét nghiệm khác nhau.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

348. HSV Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của virus herpes trong máu toàn phần, huyết tương, dịch não tủy, nước tiểu, dịch vết loét hoặc mảnh sinh thiết của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (- 20°C hoặc -70°C)
- Micropipette các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chất chống đông EDTA, huyết tương, dịch não tủy, nước tiểu, dịch vết loét, dịch đường sinh dục, mảnh sinh thiết.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm HSV rPCR Mix (VD)

a. Thu nhận và xử lý mẫu

Chuẩn bị mẫu và ống 1,5 ml: đánh số trên mẫu bệnh phẩm và ống 1,5 ml dùng để tách chiết DNA

- Thể tích mẫu $\leq 500\mu\text{l}$: Trộn đều rồi hút trực tiếp để tách chiết.
- $500\mu\text{l} < \text{thể tích mẫu} \leq 1.5\text{ml}$: Cho mẫu vào tube 1.5ml, ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 5 phút, thu cạn (phần cạn và dịch còn lại khoảng $500\mu\text{l}$). Trộn đều, dùng $100\mu\text{l}$ cho tách chiết.
- Thể tích mẫu $> 1.5\text{ml}$: Tùy thể tích, cho mẫu vào falcon 15ml hoặc 50ml, ly tâm ở 4500 vòng/phút trong 20 phút, thu cạn (phần cạn và dịch còn lại khoảng $500\mu\text{l}$). Trộn đều, dùng $100\mu\text{l}$ cho tách chiết.

Nếu chưa tách chiết ngay, bảo quản mẫu ở -20°C (phải trộn đều trước khi tách chiết)

b. Tách chiết DNA

- Cho $10\mu\text{l}$ chứng nội chuẩn vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết.
- Tách chiết bằng máy Hoặc Tách chiết thủ công theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Bảo quản mẫu DNA ở -20°C nếu không chạy phản ứng real-time PCR ngay.

c. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng}$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Hút $30\mu\text{l}$ Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.
- Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.
- Cho vào mỗi ống PCR $10\mu\text{l}$ DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, $10\mu\text{l}$ chứng dương và $10\mu\text{l}$ chứng âm. Thể tích cuối cùng là $40\mu\text{l}$.

- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:

Màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện HSV-1, CY5 cho phát hiện HSV-2, màu HEX cho phát hiện chứng nội.

- Chu kỳ nhiệt:

+ 1 chu kỳ: 37 °C/2 phút

+ 1 chu kỳ: 95 °C/10 phút

+ 45 chu kỳ: 95 °C/5 giây

60 °C/40 giây – đọc sản phẩm

72 °C/20 giây

Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.

Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM và màu Cy5 tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (đường biểu diễn dương tính) và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính hoặc bằng và không vượt qua tín hiệu nền (đường biểu diễn âm tính).
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính

4.2.2. Đọc kết quả

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng và bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu từ sau chu kỳ 36 → thực hiện lại xét nghiệm hoặc đề nghị lấy mẫu lại xét nghiệm lại.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
- + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
- + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
- + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
- + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

349. HSV đo tải lượng hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Đếm số lượng bản copies của virus Herpes simplex trong một đơn vị thể tích mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, trong đó nồng độ đoạn gen đích ban đầu có thể được xác định.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HSV đo tải lượng
- Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao, vật tư thay thế
- Sinh phẩm, hóa chất
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Kít tách DNA theo hãng
- Ethanol
- Dung dịch nước rửa tay
- Cồn sát trùng tay nhanh
- Dung dịch khử trùng
- Cồn
- Bơm kim tiêm
- Đầu côn có lọc 1000 µl (DNAase- RNAase free)
- Đầu côn 1000 µl
- Panh
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Alcolpad
- Giấy thấm

- Giấy xét nghiệm
- Sổ lưu kết quả xét nghiệm
- Bút viết kính
- Bút bi
- Mũ
- Khẩu trang
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Hệ thống máy tách chiết tự động và định lượng được HSV.
- Bộ lưu điện

2.3. Mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch não tủy (CSF), máu toàn phần được thu thập trong EDTA, huyết tương được thu thập trong EDTA.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Từ lúc nhận mẫu tại phòng xét nghiệm đến lúc trả kết quả: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ kit có thể được sử dụng để thực hiện chạy tích hợp tách chiết DNA và khuếch đại DNA, đọc kết quả trên máy (thực hiện theo quy trình hướng dẫn máy của nhà sản xuất)

4.2. Nhận định kết quả

Các giá trị chứng của HSV có nồng độ trong giới hạn được thực hiện đồng thời với mẫu bệnh phẩm để thiết lập đường chuẩn, cho thấy mối tương quan giữa giá trị Ct và số copies/ml.

4.3. Diễn giải, trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Đọc và nhận định kết quả: theo hướng dẫn nhà sản xuất (VD tương đương)

Giá trị trên máy	Trả lời kết quả
Target Not Detected	Không phát hiện HSV-DNA
< 119 copies/ml	< 119 copies/ml
> 119 Copies/ml đến < 25.000.000 copies/ml	Nhận những kết quả trong giới hạn này > 119 copies/ml đến < 25.000.000 copies/ml. Trả kết quả con số cụ thể
> 25.000.000 copies/ml	> 25.000.000 copies/ml
Invalid	Không giá trị, chạy lại mẫu bệnh phẩm

4.3.1 Trả kết quả và lưu hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Đặt ống mẫu và thuốc thử không đúng vị trí trên máy.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

Nhầm lẫn kết quả xét nghiệm giữa các mẫu thử, trả kết quả nhầm cho bệnh nhân.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT).
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

350. EBV đo tải lượng hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện và định lượng DNA đặc trưng của Epstein-Barr virus trong mẫu bệnh phẩm huyết tương của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm EBV Test (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Control (chứng dương+chứng âm)
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Ống đựng bệnh phẩm
- Bơm tiêm 5 ml vô trùng
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm không bụi
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy PCR tự động
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a) *Thu nhận và xử lý mẫu*

b) *Vận hành máy xét nghiệm:*

- Khởi động hệ thống: Chờ đến khi trạng thái Standby được hiển thị trên thanh trạng thái của phần mềm.
- Đăng nhập vào hệ thống: theo hướng dẫn nhà sản xuất.
- Nạp mẫu bệnh phẩm:
 - + Chọn khe nạp mẫu mong muốn.
 - + Đưa phần mặt trước của khay mẫu trượt vào khe nạp cho đến khi khay mẫu bị chặn lại. Đèn trạng thái khe nạp mẫu sẽ sáng lên.
 - + Khi đèn trạng thái vừa tắt, đẩy khay mẫu tiếp tục trượt vào khe nạp mẫu cho đến khi khay nạp nằm hoàn toàn bên trong hệ thống.
- Kiểm tra tình trạng mẫu.
- Kiểm tra vật tư tiêu hao và hóa chất bị thiếu.
- Bỏ các đĩa khuếch đại đã qua sử dụng và nạp các hộp đĩa khuếch đại mới.
- Thay thế các bình thái lỏng đã đầy.
- Thay thế túi chứa chất thải rắn.
- Nạp các hóa chất thể tích lớn.
- Nạp các vật tư tiêu hao.
- Bỏ và nạp mới hộp bi từ.
- Bỏ và nạp mới các hộp thuốc thử.
- Bỏ và nạp các khay chứng.
- Bắt đầu mẻ chạy.
- Kiểm tra lịch trình của các mẻ chạy.
- Sau khi mẻ chạy hoàn thành, kiểm tra và trả kết quả.

c) *Bảo dưỡng cuối ngày:* Hoàn tất công việc vệ sinh máy

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

Xem xét kết quả QC:

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - + NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
 - + Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả: theo hướng dẫn nhà sản xuất (VD tương đương)

Ngưỡng phát hiện của bộ sinh phẩm là 35 IU/ml. Dải đo: 35 IU/ml đến 1.0×10^8 IU/ml.

Kết quả	Diễn giải và báo cáo kết quả
Target Not Detected	Không phát hiện EBV
< Titer Min	< 35 IU/ml
Titer	Kết quả nằm trong khoảng đo. Báo cáo kết quả theo số đo được (IU/ml).
>Titer Max	> 1.0×10^8 IU/ml.
Invalid	Kết quả không có giá trị. Thực hiện lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Kết quả có thể âm tính giả trong các trường hợp sau:

- Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng:
 - Môi trường: Sử dụng quá nhiều a-xít hypochlorous trong khử nhiễm phòng thí nghiệm.
 - Sử dụng găng có bột talc khi thực hiện xét nghiệm.

- Kết quả có thể dương tính giả trong các trường hợp sau:
 - Có sự lây nhiễm chéo giữa các mẫu bệnh phẩm.
 - Lây nhiễm các sản phẩm khuyếch đại từ lần phản ứng trước

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

351. VZV Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của Varicella - Zoster Virus (VZV) trong huyết thanh, huyết tương, dịch não tủy hoặc dịch nốt phỏng ở người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương, dịch não tủy, dịch nốt phỏng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

** Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR*

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng}$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chia Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

** Real-time PCR:* Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 10 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 µl chứng dương và 10 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 40µl.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:
 - + Màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện VZV, màu HEX cho phát hiện chứng nội.
 - + Chu kỳ nhiệt:

- 1 chu kỳ: 37 °C/2 phút
- 1 chu kỳ: 95 °C/10 phút
- 45 chu kỳ: 95 °C/5 giây

60 °C/40 giây – đọc sản phẩm

72 °C/20 giây

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

Mẫu chứng	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương	+	$\pm$	Có giá trị
Chứng âm	-	+	Có giá trị

- Các trường hợp cần kiểm tra lại:

Mẫu chứng	Màu FAM	Màu HEX	DIỄN GIẢI
Chứng dương	-	+	Cần kiểm tra lại
Chứng âm	+	-	Cần kiểm tra lại

4.2.2. Đọc kết quả

Có những trường hợp sau:

STT	Màu FAM	Màu HEX	KẾT QUẢ
1	+ ($Ct \leq 38$)	$\pm$	Dương tính với VZV
2	-	+ ($Ct \leq 38$)	Âm tính
3	-	+ ($Ct > 38$) hoặc -	Không có giá trị $\rightarrow$ thực hiện lại XN.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.

Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

352. EBV-VCA IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng lại kháng nguyên vỏ capsid của Epstein-Barr Virus (Epstein-Barr Virus Viral Capsid Antigen - EBV VCA) bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgM kháng lại kháng nguyên vỏ capsid của Epstein Barr Virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Nhỏ chứng và huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
7	Đậy tấm và ủ
8	Rửa
9	Nhỏ chất cộng hợp
10	Đậy tấm và ủ.
11	Rửa
12	Nhỏ dung dịch hiện màu
13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
 - + Tính giá trị trung bình của các calibrator (CO trung bình). Loại bỏ những calibrator có giá trị lớn hơn giá trị trung bình 25 % và tính lại giá trị trung bình này.

- + Yếu tố hiệu chỉnh (Correction Factor-CF): Yếu tố này thay đổi ở mỗi lô hóa chất và được in trên lọ calibrator.

Điều kiện của phản ứng

- OD blank < 0,15
- OD chứng âm ≤ 0.25 .
- OD calibrator $\geq 0,25$
- OD chứng dương $\geq 0,5$
- ISR cho chứng âm, chứng dương I và chứng dương II phải nằm trong khoảng mong đợi của nhà sản xuất được in trên lọ hóa chất.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Giá trị ngưỡng (CO)

$$CO = CF \times CO \text{ trung bình}$$

- Tính tỷ số tình trạng miễn dịch (Immune Status Ratio-ISR) cho mỗi bệnh phẩm

$$ISR = OD \text{ bệnh phẩm} : OD \text{ CO}$$

- + Dương tính: nếu $ISR \geq 1.1$
- + Nghi ngờ: nếu $0.91 \leq ISR \leq 1.09 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm
- + Âm tính: nếu $ISR \leq 0.90$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ

kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

353. EBV-VCA IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên vỏ capsid của Epstein-Barr Virus (Epstein-Barr Virus Viral Capsid Antigen - EBV VCA) bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên vỏ capsid của Epstein Barr Virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Nhỏ chứng và huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
7	Đậy tấm và ủ
8	Rửa
9	Nhỏ chất cộng hợp
10	Đậy tấm và ủ.
11	Rửa
12	Nhỏ dung dịch hiện màu
13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
 - + Tính giá trị trung bình của các calibrator (CO trung bình). Loại bỏ những calibrator có giá trị lớn hơn giá trị trung bình 15 % và tính lại giá trị trung bình này.

- + Yếu tố hiệu chỉnh (Correction Factor-CF): Yếu tố này thay đổi ở mỗi lô hóa chất và được in trên lọ calibrator.

Điều kiện của phản ứng

- OD blank < 0,15
- OD chứng âm ≤ 0.25 .
- OD calibrator $\geq 0,25$
- OD chứng dương $\geq 0,5$
- ISR cho chứng âm, chứng dương I và chứng dương II phải nằm trong khoảng mong đợi của nhà sản xuất được in trên lọ hóa chất.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Giá trị ngưỡng (CO)

$$CO = CF \times CO \text{ trung bình}$$

- Tính tỷ số tình trạng miễn dịch (Immune Status Ratio-ISR) cho mỗi bệnh phẩm

$$ISR = OD \text{ bệnh phẩm} : OD \text{ CO}$$

- + Dương tính: nếu $ISR \geq 1.1$
- + Nghi ngờ: nếu $0.91 \leq ISR \leq 1.09 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm
- + Âm tính: nếu $ISR \leq 0.90$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ

kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

354. EBV EA-D IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên sớm của Epstein-Barr Virus trong huyết thanh hoặc huyết tương người (Epstein-Barr Virus Early Antigen Diffuse - EBV EA-D) bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên sớm của Epstein-Barr Virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Nhỏ chứng và huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
7	Đậy tấm và ủ
8	Rửa
9	Nhỏ chất cộng hợp
10	Đậy tấm và ủ.
11	Rửa
12	Nhỏ dung dịch hiện màu
13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
 - + Tính giá trị trung bình của các calibrator (CO trung bình). Loại bỏ những calibrator có giá trị lớn hơn giá trị trung bình 15 % và tính lại giá trị trung

bình này.

- + Yếu tố hiệu chỉnh (Correction Factor-CF): Yếu tố này thay đổi ở mỗi lô hóa chất và được in trên lọ calibrator.

- Điều kiện của phản ứng

- + OD blank < 0,15
- + OD chứng âm ≤ 0.25 .
- + OD calibrator $\geq 0,25$
- + OD chứng dương $\geq 0,5$
- + ISR cho chứng âm, chứng dương I và chứng dương II phải nằm trong khoảng mong đợi của nhà sản xuất được in trên lọ hóa chất.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Giá trị ngưỡng (CO)

$$CO = CF \times CO \text{ trung bình}$$

- Tính tỷ số tình trạng miễn dịch (Immune Status Ratio-ISR) cho mỗi bệnh phẩm

$$ISR = OD \text{ bệnh phẩm} : OD \text{ CO}$$

- + Dương tính: nếu $ISR \geq 1.1$
- + Nghi ngờ: nếu $0.91 \leq ISR \leq 1.09 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm
- + Âm tính: nếu $ISR \leq 0.90$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chủng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

355. EBV EB-NA IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên nhân của Epstein-Barr virus trong huyết thanh hoặc huyết tương người (Epstein-Barr Nuclear Antigen-1 - EBV EB-NA-1) bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên nhân của Epstein Barr Virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm

- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Nhỏ chứng và huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
7	Đậy tấm và ủ
8	Rửa
9	Nhỏ chất cộng hợp
10	Đậy tấm và ủ.
11	Rửa
12	Nhỏ dung dịch hiện màu
13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
 - + Tính giá trị trung bình của các calibrator (CO trung bình). Loại bỏ những

calibrator có giá trị lớn hơn giá trị trung bình 15 % và tính lại giá trị trung bình này.

- + Yếu tố hiệu chỉnh (Correction Factor-CF): Yếu tố này thay đổi ở mỗi lô hóa chất và được in trên lọ calibrator.
- Điều kiện của phản ứng
 - + OD blank < 0,15
 - + OD chứng âm ≤ 0.25 .
 - + OD calibrator $\geq 0,25$
 - + OD chứng dương $\geq 0,5$
 - + ISR cho chứng âm, chứng dương I và chứng dương II phải nằm trong khoảng mong đợi của nhà sản xuất được in trên lọ hóa chất.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Giá trị ngưỡng (CO)

$$CO = CF \times CO \text{ trung bình}$$

- Tính tỷ số tình trạng miễn dịch (Immune Status Ratio-ISR) cho mỗi bệnh phẩm

$$ISR = OD \text{ bệnh phẩm} : OD \text{ CO}$$

- + Dương tính: nếu $ISR \geq 1.1$
- + Nghi ngờ: nếu $0.91 \leq ISR \leq 1.09 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm
- + Âm tính: nếu $ISR \leq 0.90$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và

những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

356. EBV-VCA IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính kháng thể IgM kháng kháng nguyên vỏ (Viral Capsid Antigen - VCA) của Epstein-Barr Virus (EBV) trong huyết thanh hoặc huyết tương của người bằng kỹ thuật CMIA (miễn dịch hóa phát quang).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật CMIA (miễn dịch hóa phát quang). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ hoạt chất phát quang gắn với KN hoặc KT hoặc KKT. Khi kết hợp với một thuốc thử kích hoạt, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ tạo ra ánh sáng. Kết quả của phản ứng hóa phát quang được tính bằng đơn vị ánh sáng tương đối (RLU).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm EBV VCA IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) 20 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiết trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Bông tiêm
- Bơm kim nhựa 10 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Dụng cụ lấy mẫu theo hướng dẫn ở sổ tay lấy mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy miễn dịch tự động (VD hoặc tương đương)
- Máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Máy ly tâm thường
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 µl, 200 µl và 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Vào Reagent để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn: + Nếu tại vị trí có ô EBV VCA IgM hiển thị dòng chữ no cal có nghĩa đó là lô thuốc thử mới cần phải hiệu chuẩn. + Khi chạy chứng EBV VCA IgM Control thấy kết quả vượt ra ngoài dải giới hạn cho phép.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên (nếu thấy cần thiết) thì tiến hành chạy chứng EBV VCA IgM Control
4	Chạy mẫu theo các bước sau:
5	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ: 6-13	
6	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương sample cup tương ứng
7	Vào màn hình Orders → Patients Orders → Single Patient
8	Nhập theo hướng dẫn nhà sản xuất
9	Chọn tên test là EBV IgM
10	Chọn theo hướng dẫn nhà sản xuất để nhập thêm thông tin bệnh nhân (nếu cần)
11	Nhấn ADD ORDER (F3).
12	Đưa khay mẫu vào khu nạp giá mẫu ở vị trí chạy mẫu bệnh nhân thường quy.
13	Khởi động chạy theo hướng dẫn nhà sản xuất - Trên màn hình chính, chọn SH & PM

	Nhấn RUN (F8)
Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ: 14-16	
14	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Quản lý thông tin phòng xét nghiệm
15	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
16	Nhấn RUN (F8)

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

- *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*
 - + Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*
 - + NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
 - + Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- ✓ Máy sẽ tự động tính giá trị trung bình tín hiệu hóa phát quang Mẫu chuẩn 1 EBV VCA IgM qua ba lần chạy lặp lại và lưu kết quả.
- ✓ Xét nghiệm EBV VCA IgM được tính kết quả dựa trên S/CO: $S/CO = RLU \text{ mẫu} / RLU \text{ ngưỡng}$

Kết quả được diễn giải như bảng dưới đây:

Kết quả ban đầu (S/CO)	Diễn giải trên thiết bị	Quy trình xét nghiệm lại
< 0.5	KHÔNG PHẢN ỨNG	Không cần thực hiện lại xét nghiệm
≥ 1	PHẢN ỨNG	Xét nghiệm lại lần hai (nếu cần)
0.5 đến 1.0	NGHI NGỜ	Xét nghiệm lại lần hai

Tất cả những mẫu bệnh phẩm sau khi kiểm tra lại lần 2:

- + Nếu $S/CO < 1$ thì kết luận âm tính.
- + Nếu $S/CO \geq 1$ giống như lần đầu thì kết luận dương tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

357. EBV-VCA IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng kháng nguyên vỏ (Viral Capsid Antigen - VCA) của Epstein-Barr Virus (EBV) trong huyết thanh và huyết tương người. Xét nghiệm được dùng để hỗ trợ chẩn đoán chứng tăng bạch cầu đơn nhân nhiễm trùng (infectious mononucleosis - IM) và hỗ trợ xác định giai đoạn nhiễm virus EBV bằng kỹ thuật CMIA (miễn dịch hóa phát quang).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật CMIA (miễn dịch hóa phát quang). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ hoạt chất phát quang gắn với KN hoặc KT hoặc KKT. Khi kết hợp với một thuốc thử kích hoạt, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ tạo ra ánh sáng. Kết quả của phản ứng hóa phát quang được tính bằng đơn vị ánh sáng tương đối (RLU).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm EBV VCA IgG (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm

- Bơm tiêm nhựa 10 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Dụng cụ lấy mẫu theo hướng dẫn ở sổ tay lấy mẫu
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy miễn dịch tự động (VD hoặc tương đương)
- Máy tính có cài đặt phần mềm chức năng
- Máy ly tâm thường
- Pipette vi lượng và đầu tip các loại: 20 µl, 200 µl và 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm EBV VCA IgG (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Vào Reagent để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn: + Nếu tại vị trí có ô EBV VCA IgG hiển thị dòng chữ no cal có nghĩa đó là lô thuốc thử mới cần phải hiệu chuẩn. + Khi chạy chứng EBV VCA IgG Control thấy kết quả vượt ra ngoài dải giới hạn cho phép.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên (nếu thấy cần thiết) thì tiến hành chạy chứng EBV VCA IgG Control
4	Chạy mẫu theo các bước sau:
5	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ: 6-13	
6	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương sample cup tương ứng
7	Vào màn hình Orders → Patients Orders → Single Patient
8	Nhập theo hướng dẫn nhà sản xuất - C/P: vị trí mẫu trên khay/ mã khay chứa mẫu - SID: mã số bệnh nhân
9	Chọn tên test là EBV IgG
10	Chọn Sample details để nhập thêm thông tin bệnh nhân (nếu cần)
11	Nhấn ADD ORDER (F3).
12	Đưa khay mẫu vào khu nạp giá mẫu ở vị trí chạy mẫu bệnh nhân thường quy.

13	Khởi động chạy RUN - Trên màn hình chính, chọn SH & PM Nhấn RUN (F8)
Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ: 14-16	
14	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Quản lý thông tin phòng xét nghiệm
15	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
16	Nhấn RUN (F8)

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

- *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*
 - Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*
 - NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
 - Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- Máy sẽ tự động tính giá trị trung bình tín hiệu hóa phát quang Mẫu chuẩn 1 EBV VCA IgG qua ba lần chạy lặp lại và lưu kết quả.
- Xét nghiệm EBV VCA IgG được tính kết quả dựa trên S/CO: $S/CO = RLU \text{ mẫu} / RLU \text{ ngưỡng}$
- Kết quả được diễn giải như bảng dưới đây:

Kết quả ban đầu (S/CO)	Diễn giải trên thiết bị	Quy trình xét nghiệm lại
< 0.75	KHÔNG PHẢN ỨNG	Không cần thực hiện lại xét nghiệm
≥ 1	PHẢN ỨNG	Xét nghiệm lại lần hai (nếu cần)
0.75 đến 1.0	NGHI NGỜ	Xét nghiệm lại lần hai

Mẫu với các kết quả vùng xám trên EBV VCA IgG có thể chứa nồng độ kháng thể VCA IgG thấp. Khuyến cáo kiểm tra các mẫu với EBV VCA IgM và EBV EBNA-1 IgG và/hoặc thu thập hoặc kiểm tra mẫu máu mới sau 1-2 tuần

- Tất cả những mẫu bệnh phẩm sau khi kiểm tra lại lần 2:
 - + Nếu $S/CO < 1$ thì kết luận âm tính.
 - + Nếu $S/CO \geq 1$ giống như lần đầu thì kết luận dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

358. EV71 IgM/IgG test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng EV71 trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương ở người bằng phương pháp sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật viên y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ kit làm xét nghiệm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1-20 μ
- Bông
- Đèn cồn
- Bông
- Đèn cồn
- Panh
- Bơm kim tiêm
- Garo
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Mũ
- Khẩu trang
- Găng tay
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ

- Ống nghiệm thủy tinh
- Bút viết kính
- Bút bi
- Bật lửa
- Sổ lưu kết quả xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Giấy trả kết quả xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Pipet vi lượng 5 μ l đến 100 μ l.
- Đồng hồ bấm giây
- Tủ âm sâu (-20oC hoặc -70oC) (nếu có)

2.3. Mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng: 30 phút – 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1 Các bước thực hiện:

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất được nêu ở trên

4.1.1 Lấy bệnh phẩm: Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh

4.1.2 Tiến trình kỹ thuật: Bộ sinh phẩm test nhanh EV 71 IgM

Đề mẫu, test thử và dung dịch pha loãng mẫu về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm từ (15-20 phút).

- Chuẩn bị test, ghi tên bệnh nhân hoặc mã số trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Cho 5 µl huyết thanh/huyết tương vào giếng S.
- Cho 3-4 giọt (khoảng 100µl) dung dịch đệm vào giếng nhỏ dung môi hình tròn.
- Đọc kết quả trong vòng 20 phút.

4.3 Nhận định kết quả

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ tía hoặc chỉ có 1 vạch.

- C là vạch chứng (Control line).
- T là vạch thử nghiệm (Test line).

4.4. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Ghi kết quả như bảng sau:

Hiện tượng	Kết quả
Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ	Dương tính
Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (vạch C)	Âm tính
Trên thanh thử không xuất hiện vạch C	Test hỏng

Lưu ý: Nếu test xét nghiệm này không xuất hiện vạch chứng thì test không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

- Dựa vào bảng đọc kết quả thực hiện trả kết quả:
 - + Dương tính với mẫu có hai vạch là vạch chứng và vạch test thử.
 - + Âm tính với mẫu thử chỉ lên vạch chứng.
 - + Sau đó nhập kết quả vào phần mềm, in kết quả trả cho lâm sàng.
- Lưu kết quả lại vào hồ sơ lưu theo qui định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Tách huyết thanh hoặc huyết tương càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tán huyết.
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu bệnh phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu huyết thanh và huyết tương có thể bảo quản ở nhiệt độ 2oC- 8oC trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn mẫu bệnh phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn (-20oC)

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không đọc kết quả sau 20 phút.
- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Khi trả kết quả cần phải kiểm tra lại một lần nữa thông tin trên phiếu kết quả, trên map thực hiện xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm của bệnh.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

359. EV71 PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của Enterovirus 71 (EV71) trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của EV71 được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR, sau đó khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi xuôi/ngược đặc hiệu. Sự có mặt của EV71 được xác định bằng cách so sánh kích thước sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- EV71: Enterovirus 71
- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Các dịch tiết từ mũi, hầu họng, nước bọt, dịch tiết từ các vết mụn nước trên da, nốt phỏng hoặc phân của người bệnh.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): Dịch ngoáy họng, dịch từ hầu được đựng trong môi trường vận chuyển virus được đựng trong lọ nhựa có nắp đậy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng EV71 chuẩn hoặc chủng EV71 đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng RT-PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit OneStep RT-PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master Mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết RNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm RNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	55	30 phút	
2	95	5 phút	1
3	95	20 giây	40
	57	30 giây	
	72	1 phút	
4	72	15 phút	1
5	4	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

360. EV71 Real - time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện gene đặc trưng của Enterovirus 71 (EV71) từ mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp real time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Water-DEPC treated
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Ống Falcol 50 ml
- Eppendorf 1,7 ml
- Eppendorf 0,2 ml
- Đầu côn 10 µl có lọc
- Đầu côn 1ml có lọc
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính - Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C hoặc -70°C)
- Micropipette các thể tích từ 5 µl -1000 µl.

2.3. Mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch não tủy, phết họng, phết trực tràng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Từ lúc nhận mẫu tại phòng xét nghiệm đến lúc trả kết quả: khoảng 300 phút (5 giờ)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Lấy bệnh phẩm:

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu.

4.1.2. Tiến trình kỹ thuật:

Bộ sinh phẩm EV/EV71 real time PCR

- Thu nhận mẫu: thu nhận mẫu và lưu mẫu trước khi tách chiết theo quy định.
- Tách chiết RNA: tách chiết RNA tổng số
- Tổng hợp cDNA: thực hiện phản ứng RT với mỗi ngẫu nhiên phiên mã ngược RNA trong dịch chiết RNA.
- Thực hiện phản ứng real time PCR
 - + Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay đá lạnh hoặc đá đang tan.
 - + Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
 - + Cho chứng dương và chứng âm hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube EV/EV 71 rPCR mix. Xong đặt các tube vào máy real-time PCR.
 - + Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
 - + Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đặt trên máy real-time PCR.
 - + Chọn màu “FAM”, “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
 - + Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động.
 - + Lưu file dữ liệu vào máy tính.
 - + Cho máy real time PCR chạy chương trình

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Điều kiện của phản ứng:

- Xem xét kết quả nội kiểm
- Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.
- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM và màu HEX tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (đường biểu diễn dương tính).
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM và màu HEX âm tính.
- Chứng nội tại có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính.

4.2.2. Phân tích mẫu: theo hướng dẫn nhà sản xuất, ví dụ

- Mẫu dương tính EV: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng với màu của từng tác nhân và bắt đầu từ chu kỳ 40 trở về trước.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu sau chu kỳ 40, đề nghị lấy mẫu lại để thực hiện xét nghiệm.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Nhập kết quả phân mềm xét nghiệm, in kết quả và lưu hồ sơ.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kênh IC (Fam (Green)) yếu hoặc không có tín hiệu: cần phải kiểm tra lại mẫu.
 - + Phản ứng PCR bị ức chế.
 - + Đảm bảo rằng bạn sử dụng phương pháp tách chiết RNA được khuyến nghị và làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
 - + Điều kiện bảo quản thuốc thử không tuân theo hướng dẫn: kiểm tra điều kiện bảo quản.
 - + Điều kiện PCR không đúng hướng dẫn: kiểm tra các điều kiện PCR và để phát hiện IC, chọn kênh huỳnh quang đã thể hiện trong quy trình.
 - + IC không được thêm vào mẫu trong quá trình hút thuốc thử: Hãy chú ý trong quá trình tách chiết RNA.
- Tín hiệu mẫu yếu ($Ct > 37$) trên kênh Joe (Yellow)/Cy3/HEX: Thực hiện kiểm tra lại mẫu.
- Negative Control xuất hiện tín hiệu trên kênh Joe (Yellow)/Cy3/HEX của quá trình tách chiết: nhiễm trong quá trình tách chiết RNA. Tất cả các kết quả mẫu đều không hợp lệ.
 - + Khử nhiễm tất cả các bề mặt và dụng cụ bằng natri hypochlorite và ethanol.
 - + Chỉ sử dụng đầu lọc trong quy trình chiết xuất. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - + Lặp lại quá trình chiết RNA với bộ thuốc thử mới.
- Bất kỳ tín hiệu nào với Negative PCR Control: Nhiễm bản trong quá trình chuẩn bị PCR. Tất cả các kết quả mẫu đều không hợp lệ.

- + Khử nhiễm tất cả các bề mặt và dụng cụ bằng natri hypochlorite và ethanol hoặc thuốc thử khử nhiễm acid nucleic đặc biệt.
- + Dùng pipet phân phối chủng dương ở giếng cuối.
- + Lặp lại quá trình chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

361. Enterovirus PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của Enterovirus (EV) trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của EV được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR, sau đó khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi xuôi/ngược đặc hiệu. Sự có mặt của EV được xác định bằng cách so sánh kích thước sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- EV: *Enterovirus*
- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Các dịch tiết từ mũi, hầu họng, nước bọt, dịch tiết từ các vết mụn nước trên da, nốt phỏng hoặc phân của người bệnh.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): Dịch ngoáy họng, dịch tỵ hầu được đựng trong môi trường vận chuyển virus được đựng trong lọ nhựa có nắp đậy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng EV chuẩn hoặc chủng EV đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo cho quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng RT-PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit OneStep RT-PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master Mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết RNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm RNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	55	30 phút	
2	95	5 phút	1
3	95	20 giây	40
	58	30 giây	
	72	1 phút	
4	72	15 phút	1
5	4	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %

- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

362. Enterovirus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện gen đặc trưng của Enterovirus trong các loại bệnh phẩm phân, dịch não tủy bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm dựa trên công nghệ MuDT™ (Công nghệ phát hiện đa đích) và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C hoặc -70°C)
- Micropipette

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân, dịch não tủy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội IC (Internal Control) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất giúp kiểm soát toàn bộ quá trình.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng Real-time RT-PCR

- Bật thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix, cụ thể:

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

- + Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng.
- + Chia 15 µl MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

- Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.
- Thêm 5 µl sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.
- Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.
- Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.
- Cài đặt chu trình nhiệt trên máy Real-time PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Cài đặt sơ đồ mẫu
- Chọn kênh màu: FAM, HEX, Cal Red 610 và Quasar 670
- Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương.

Lưu ý: chọn loại đĩa: BR White

- Bắt đầu chạy chương trình. Lưu file dữ liệu vào thư mục thích hợp.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng nội (IC) được bổ sung để kiểm soát quá trình tách chiết acid nucleic và phản ứng PCR. Nếu chứng nội dương tính chứng tỏ quá trình tách chiết và phản ứng PCR thành công. Tuy nhiên sự phát hiện chứng nội ở kênh Quasar 670 là không cần thiết nếu kết quả dương tính với tác nhân đích. Hiệu giá cao hoặc yếu tố phân tích khác có thể làm giảm hoặc làm mất tín hiệu IC.
- Chứng dương và chứng âm được bổ sung trong mỗi mẻ chạy để kiểm soát chất lượng sinh phẩm và quá trình chạy mẫu.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khi quá trình Real-time PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.
- Phân tích kết quả trong phần mềm của nhà sản xuất cài đặt trên máy tính.
- Diễn giải kết quả:
 - + Kết quả dương khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) ≤ 42 .
 - + Kết quả âm khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) > 42 hoặc N/A

Kênh mẫu	V2	
	Đường 1	Đường 2
FAM	ADV	HPeV
HEX	B19	MV
Cal Red 610	-	EV
Quasar 670	IC	-

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

363. Adenovirus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của Adenovirus từ bệnh phẩm (dịch viêm kết mạc mắt, dịch đường hô hấp...) bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml

- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (- 20°C hoặc -70°C)
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch viêm kết mạc mắt, dịch đường hô hấp...
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất Bộ sinh phẩm Real-time PCR định tính Adenovirus

a. Tách chiết DNA

Có thể dùng kit tách chiết DNA thủ công hoặc bằng máy tách chiết tự động.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube Adenovirus rPCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “CY5” và cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu CY5 dương tính hoặc âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu CY5 dương tính

4.2.2. Đọc kết quả

- Những mẫu dương tính chỉ cần chọn màu FAM để phân tích, không cần quan tâm đến chứng nội, chứng nội có thể dương hoặc âm.
- Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
 - Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
 - Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

364. Coronavirus PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của Coronavirus trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của Coronavirus được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR, sau đó khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi xuôi/ngược đặc hiệu. Sự có mặt của Coronavirus được xác định bằng cách so sánh kích thước sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng với thang ADN chuẩn.

Định nghĩa

- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Các dịch tiết từ mũi, hầu họng.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): Dịch ngoáy họng, dịch ty hầu được đựng trong môi trường vận chuyển virus được đựng trong lọ nhựa có nắp đậy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng Coronavirus chuẩn hoặc chủng Coronavirus đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng RT-PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit OneStep RT-PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master Mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết RNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm RNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	55	30 phút	
2	95	5 phút	1
3	95	20 giây	40
	56	30 giây	
	72	1 phút	
4	72	15 phút	1
5	4	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %

- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả qua trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

365. Coronavirus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện gen đặc trưng của Coronavirus (gồm 229E, OC43, NL63) trong bệnh phẩm đường hô hấp của người bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm dựa trên công nghệ MuDT™ (Công nghệ phát hiện đa đích) và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính
- Hệ thống máy tách chiết tự động hoặc hóa chất tách thủ công.
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0.2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C)
- Micropipettes các thể tích từ 5-1000µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm đường hô hấp: dịch ngoáy hầu họng và miệng hầu, và đờm (nếu có); dịch khí quản hoặc dịch rửa phế quản, phế nang với bệnh nhân có triệu chứng nặng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Lưu ý cần xử lý với các mẫu nhầy: thêm 2 thể tích dung dịch 1X PBS hoặc dung dịch muối vào 1 thể tích mẫu, vortex để phân tán mẫu

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

10 µL IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic như bảng sau. IC có thể được bổ sung vào dung dịch dung giải hoặc bổ sung vào hỗn hợp mẫu bệnh phẩm và dung dịch dung giải.

b. Thực hiện phản ứng Real-time RT-PCR

- Bật thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix, cụ thể:

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

- + Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng.
- + Chia 17 µl MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

- Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.
- Thêm 8 µl sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.
- Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.
- Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.

- Cài đặt chu trình nhiệt trên máy Real-time PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Cài đặt sơ đồ mẫu
- Chọn kênh màu: FAM, HEX, Cal Red 610 và Quasar 670
- Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương.

Lưu ý: chọn loại đĩa: BR White

- Bắt đầu chạy chương trình. Lưu file dữ liệu vào thư mục thích hợp.
- Bắt đầu quá trình chạy realtime PCR

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản, chứng âm không có bất kỳ đường đồ thị huỳnh quang nào xuất hiện.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khi quá trình Real-time PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.
- Phân tích kết quả trong phần mềm của nhà sản xuất cài đặt trên máy tính.
- Diễn giải kết quả:
 - + Kết quả dương khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) ≤ 42 .
 - + Kết quả âm khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) > 42 hoặc N/A

Kênh màu	RP3	
	Đường 1	Đường 2
FAM	OC43	HBoV
HEX	229E	NL63
Cal Red 610	HRV	-
Quasar 670	IC	-

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1 Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn: $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn: $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử: $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 37$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ.
- $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
- $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
- $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
- $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

366. Hantavirus test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG/IgM của Hantavirus có trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Kháng thể có trong huyết thanh/huyết tương của người nhiễm Hantavirus kết dính vào cộng hợp kháng nguyên Hanta tại vùng cộng hợp, tạo thành phức hợp miễn dịch. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, sự có mặt của kháng thể kháng Hantavirus thể hiện qua kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa

- Vạch C (Control line): Vạch chứng
- Vạch T (Test line): Vạch thử nghiệm mẫu người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh/huyết tương
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng trong vòng 60 phút (1 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Để thanh thử, mẫu huyết thanh vào dung môi pha loãng về nhiệt độ phòng.
- Nhỏ 10µl huyết thanh/huyết tương hoặc 20µl máu toàn phần vào vị trí S trên thanh test. Nhỏ 3 - 4 giọt dung môi vào giếng (S)

- Đọc kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.
- Khi kết quả nghi ngờ → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ thì trả kết quả “Không xác định”.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót có thể gặp khi:
- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Tính ổn định của hóa chất xét nghiệm có thể bị ảnh hưởng bởi độ ẩm, do đó nên thực hiện xét nghiệm ngay sau khi mở test.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

367. Hantavirus PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện sự có mặt của Hantavirus có trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của Hantavirus được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR, sau đó khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi xuôi/ngược đặc hiệu. Sự có mặt của Hantavirus được xác định bằng cách so sánh kích thước sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng với thang ADN chuẩn trên gel agarose điện di.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng

- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiết trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết tương, huyết thanh, dịch cơ thể.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng Hantavirus chuẩn hoặc chủng Hantavirus đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng RT-PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit OneStep RT-PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendof 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master Mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 10 μl sản phẩm tách chiết RNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm RNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	55	30 phút	
2	95	5 phút	1
3	95	20 giây	40
	56	30 giây	
	72	1 phút	
4	72	15 phút	1
5	4	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.

- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bỏ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

368. HPV PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện sự có mặt của Human papilloma virus (HPV) có trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của HPV được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi xuôi/ngược đặc hiệu. Sự có mặt của HPV được xác định bằng cách so sánh kích thước sản phẩm PCR đoạn ADN đặc trưng với thang ADN chuẩn trên gel agarose điện di.

Định nghĩa

- HPV: Human papilloma virus
- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ARN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C

- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch quệt cổ tử cung, mảnh sinh thiết....
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng HPV chuẩn hoặc chủng HPV đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN

không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	95	5 phút	1
2	95	20 giây	38
3	56	30 giây	
	72	1 phút	
	72	15 phút	1
4	4	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.

- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μ l sản phẩm PCR + 1.5 μ l Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có sản phẩm PCR, thì có thể kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm và chứng NTC đều có sản phẩm PCR, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có sản phẩm PCR, mẫu chứng âm và mẫu NTC không có sản phẩm, thì kết quả đó sẽ được sử dụng để xác định trình tự.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

369. HPV Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của Human papillomavirus (HPV) trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân nhiễm HPV bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của HPV được khuếch đại và phát hiện bằng kỹ thuật Real-time PCR sử dụng cặp mồi và probe đặc hiệu. Sự có mặt của HPV DNA được xác định dựa trên đường đồ thị huỳnh quang của phản ứng Real-time PCR.

Định nghĩa

- HPV: Human papillomavirus
- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên tục
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy Real-time PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 μ l – 1000 μ l

- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: dịch quệt cổ tử cung, mảnh sinh thiết...
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HPV chuẩn hoặc mẫu HPV dương tính đã được xác định. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống master mix trong kit sinh phẩm sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.
- Chia Master Mix vào mỗi ống phản ứng PCR (thể tích tùy theo loại sinh phẩm sử dụng):

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂ (25 mM)	4
3	Mồi xuôi	2
4	Mồi ngược	2
5	Probe huỳnh quang	1
6	H ₂ O	11
7	DNA khuôn	5
8	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

- Chuyển sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	95	5 phút	1
2	95	20 giây	45
	60	1 phút (đọc huỳnh quang)	
3	10	5 phút	1

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Thực hiện phân tích kết quả theo hướng dẫn của loại sinh phẩm hóa chất đang sử dụng.
- Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.
- Chứng âm không có đường huỳnh quang nào xuất hiện hoặc xuất hiện đồ thị huỳnh quang dưới đường giới hạn cơ bản.
- Chứng nội tại phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.

- Đường đồ thị huỳnh quang của mẫu có thể xuất hiện hoặc không xuất hiện trên đường giới hạn, căn cứ vào đó để kết luận kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm: Nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách, phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy
- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có đồ thị huỳnh quang, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có đồ thị huỳnh quang, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có đồ thị huỳnh quang, mẫu chứng âm không có đồ thị huỳnh quang, kết quả đó sẽ được sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm

- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

370. HPV genotype Real-time PCR hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính và xác định DNA đặc trưng của 14 genotype (kiểu gen) nguy cơ cao của papillomavirus ở người (HPV), bao gồm 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 và 68 trong mẫu bệnh phẩm. Xét nghiệm xác định cụ thể các kiểu gen HPV 16, 18 và 45 trong khi báo cáo phát hiện đồng thời các kiểu gen có nguy cơ cao khác (31/33/52/58) và (35/39/51/56/59/66/68) ở mức độ nhiễm trùng có ý nghĩa lâm sàng bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh, bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm HR HPV Amp. Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng
- Mẫu chứng HPV (HPV CONTROL Kit)
- Bộ thuốc thử dùng chiết tách mẫu HPV (Sample Prep Kit 1)
- Dung dịch dùng ly giải mẫu xét nghiệm (Lysis Solution)
- Dung dịch Ethanol (Alinity m Ethanol Solution)
- Dung dịch pha loãng mẫu xét nghiệm (Diluent Solution)
- Dung dịch chống bay hơi mẫu xét nghiệm (Vapor Barrier Solution)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 50 µl (Pipette Tips, 50 µL)
- Đầu côn 1000 µl (Pipette Tips, 1000 µL)
- Khay phản ứng (Integrated Reaction Units)
- Bộ lấy mẫu Collect Specimen Collection Kit

- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Bộ lấy mẫu Collect Specimen Collection Kit
- Giấy thấm không bụi
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khảm
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy PCR tự động
- Bộ lưu điện
- Máy Vortex
- Bộ chuyển đổi tám theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Máy ly tâm với rôto đĩa xoay có khả năng chứa bộ chuyển đổi tám và có khả năng $\geq 100g$
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 μl đến 1000 μl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch cổ tử cung, dịch sinh dục.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (6 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a) *Thực hiện bảo trì máy:*

- Kiểm tra trạng thái bảo trì ở mục “Overview > Procedures >
- Thực hiện bảo trì nếu đến hạn:
 - Chọn “Monthly” nếu thực hiện bảo trì hàng tuần.
 - Chọn “Weekly” nếu thực hiện bảo trì hàng tuần.
 - Chọn “To do” nếu thực hiện bảo trì hàng ngày.
 - Chọn “As Needed” nếu thực hiện bảo trì khi cần thiết.

b) *Chuẩn bị hóa chất và vật tư tiêu hao:*

Lấy hóa chất và vật tư tiêu hao cần thiết. Tất cả hóa chất cần được ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi nạp vào máy. Thực hiện theo hướng dẫn nhà sản xuất:

- + Nạp ACT TRAY 2 lên để giữ khay
- + Nạp để giữ khay (cùng với khay ACT TRAY 2) lên máy ly tâm văng có khả năng giữ đế. Quay ở 100 đến 800g trong 1 đến 5 phút để loại bỏ bong bóng có thể có.
- + Ngay sau khi ly tâm, cẩn thận chuyển ACT TRAY 2 sang các giá mang khay Assay Tray Carrier. Cẩn thận để giảm thiểu việc làm khuấy động ACT TRAY 2. Nạp các giá mang khay theo hướng dẫn vận hành của nhà sản xuất.
- + Nếu có sự khuấy động trong quá trình chuyển có thể sẽ tạo ra bong bóng khí (ví dụ rơi, va chạm, đảo ngược khay ACT TRAY 2) thì ly tâm lại khay ACT TRAY 2.
- Trước khi chạy mẫu xét nghiệm, kiểm tra tình trạng mẫu chứng. Mẫu chứng có thể chạy riêng hoặc chung cùng với mẫu bệnh phẩm.

c) *Chuẩn bị chạy mẫu:*

Từ màn hình Create Order (Tạo lệnh), chọn xét nghiệm cần chạy (HR HPV).

Hệ thống máy xét nghiệm sẽ theo dõi thời gian bảo quản trên hệ thống của các thuốc thử khuếch đại, mẫu chứng, và mẫu xét nghiệm trong khi ở trên thiết bị. Hệ thống xét nghiệm sinh học phân tử sẽ không cho phép dùng các thuốc thử khuếch đại, mẫu chứng, hoặc xử lý các mẫu xét nghiệm đã quá thời gian tối đa lưu trên hệ thống. Các mẫu bệnh phẩm được thu thập bằng Bộ lấy mẫu đa năng theo hướng dẫn nhà sản xuất có thể được đặt trên giá mẫu Universal Sample Rack nằm trên hệ thống trong tối đa 4 giờ trước khi xử lý.

d) *Bảo dưỡng cuối ngày:*

- Hoàn tất công việc vệ sinh máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

- Xem xét kết quả QC:

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*

Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*

NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC

Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả:

Kết quả và diễn giải cho xét nghiệm HR HPV được xác định dựa trên việc so sánh số chu kỳ của mẫu xét nghiệm (CN) trong mỗi tín hiệu HPV dựa trên tín hiệu cụ thể, được thiết lập các giá trị ngưỡng. Năm tín hiệu HPV được đo bằng huỳnh quang riêng biệt các kênh tương ứng với HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 31/33/52/58 (tín hiệu gộp: một tín hiệu duy nhất tương ứng với bất kỳ cá nhân nào kiểu gen hoặc sự kết hợp của các kiểu gen trong nhóm) và HPV 35/39/51/56/59/66/68 (tín hiệu gộp) được đánh giá cho từng mẫu. Mỗi tín hiệu được xác định là:

- “Detected” (Phát hiện) nếu $CN \leq$ chu kỳ ngưỡng cố định cho tín hiệu đó.
- “Not detected” (Không phát hiện) nếu CN không được tạo hoặc CN lớn hơn chu kỳ ngưỡng.
- Tất cả các tín hiệu được phát hiện (HPV 16, HPV 18, HPV 45, Other HR HPV A hoặc Other HR HPV B) đều được báo cáo trong kết quả mẫu:
 - + HPV 16, HPV 18, HPV 45: được báo cáo riêng rẽ từng type.
 - + HPV 31/33/52/58 có tín hiệu: được báo cáo Other HR HPV A.
 - + HPV 35/39/51/56/59/66/68 có tín hiệu: được báo cáo Other HR HPV B

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 37$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

371. HPV genotype PCR hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định genotype của Human papiloma virus (HPV) trong bệnh phẩm đường sinh dục bằng hệ thống tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định genotype của HPV và dựa trên nguyên lý của kỹ thuật real-time PCR.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Hệ thống máy tách chiết tự động, máy khuấy đại và phát hiện tự động
- Hệ thống máy tính.
- Bộ lưu điện
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Micropipette 1000 µl.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch sinh dục, mẫu quệt cổ tử cung, mảnh sinh thiết được chứa trong các dung dịch bảo quản mẫu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết DNA bằng máy tự động

b. Khuyếch đại HPV-DNA và đọc kết quả bằng máy tự động

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Giá trị định type chấp nhận được nếu :
 - Chứng âm: Valid (Không phát hiện DNA ở bất kỳ kênh nào)
 - Chứng dương: Valid (phát hiện DNA ở cả 4 kênh: kênh cho type 16, 18, nhóm nguy cơ cao và beta-globin)
- Không nhận kết quả nếu chứng âm hoặc chứng dương invalid

4.2.2. Đọc kết quả

Kết quả định type HPV sẽ cho ra cụ thể bị nhiễm HPV 16, HPV 18 hoặc bị nhiễm một trong 12 type nguy cơ cao 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.

- Kết quả của mẫu bệnh phẩm được diễn giải như sau:

+ Khi chọn xét nghiệm là HPV High Risk Panel

HPV test	Diễn giải kết quả
HR HPV POS	High Risk HPV Positive Kết quả dương tính với một hoặc nhiều type HPV
HR HPV NEG	High Risk HPV Negative Kết quả HPV âm tính
Invalid	High Risk HPV Invalid Kết quả không có giá trị, mẫu cần xét nghiệm lại.

+ Khi chọn xét nghiệm là HPV High Risk Panel Plus Genotyping

HPV Test	Kết quả báo cáo và diễn giải
Other HR HPV POS, HPV16 POS, HPV18 POS	Other High Risk HPV Positive, HPV16 Positive, HPV18 Positive. Mẫu dương tính với HPV type 16 và 18 và một hoặc nhiều loại HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.
Other HR HPV POS, HPV16 POS, HPV18 NEG	Other High Risk HPV Positive, HPV 16 Positive, HPV 18 Negative Mẫu dương tính với HPV type 16 và một hoặc nhiều loại HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Không phát hiện HPV type 18 hoặc HPV type 18 dưới ngưỡng phát hiện

Other HR HPV POS, HPV16 NEG, HPV18 POS	Other High Risk HPV Positive, HPV16 Negative*, HPV18 Positive. Mẫu dương tính với HPV type 18 và một hoặc nhiều loại HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Không phát hiện HPV type 16 hoặc HPV type 16 dưới ngưỡng phát hiện
Other HR HPV POS, HPV16 NEG, HPV18 NEG	Other High Risk HPV Positive, HPV16 Negative*, HPV18 Negative. Mẫu dương tính với một hoặc nhiều loại HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Không phát hiện HPV type 16 và HPV type 18 hoặc HPV type 16 và HPV type 18 dưới ngưỡng phát hiện.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

372. Influenza virus A, B test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên virus cúm typ A và typ B trong bệnh phẩm đường hô hấp bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện Influenza antigen A,B bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Que tăm bông lấy dịch tỵ hầu, dịch họng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giây
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch tỵ hầu, dịch họng của bệnh nhân
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Xét nghiệm phát hiện Influenza Antigen typs A, B
1	Dùng que tăm bông lấy dịch tỵ hầu hoặc dịch họng
2	Đặt que lấy mẫu vào ống đựng mẫu, ghi mã bệnh phẩm tương ứng
3	Nhỏ dung dịch pha loãng vào ống đựng mẫu, trộn đều với bệnh phẩm
4	Đặt thanh xét nghiệm vào ống đựng mẫu theo đúng vạch quy định
5	Đọc kết quả sau 10 – 15 phút

4.2. Nhận định kết quả

- Kết quả được chấp nhận khi xuất hiện rõ ràng, sắc nét ở vạch chứng C
- Dương tính cúm A: khi xuất hiện màu ở vạch C và vạch A
- Dương tính cúm B: khi xuất hiện màu ở vạch C và vạch B
- Âm tính: khi xuất hiện màu ở vạch chứng C và không xuất hiện màu ở các vạch còn lại.

- Không có giá trị: vạch chứng C không xuất hiện sau 15-10 phút thì cần kiểm tra lại hóa chất, các bước thực hiện, làm lại test khác

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Xử trí: Từ chối mẫu khi chất lượng mẫu không đạt

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn
- Đọc kết quả trước hoặc sau thời gian qui định có thể làm sai lệch kết quả.
- Test xét nghiệm cắm quá sâu, quá vạch qui định có thể làm kết quả sai lệch
- Xử trí:
- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Nhân viên phải được đánh giá năng lực hàng năm đạt mới được thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt.
- Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQA theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

373. Influenza virus A, B Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện gen đặc trưng của virus cúm A và B trong bệnh phẩm đường hô hấp bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm dựa trên công nghệ MuDT™ (Công nghệ phát hiện đa đích) và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch hầu họng, dịch ty hầu, dịch súc họng, các loại dịch đường hô hấp dưới (đờm, dịch phế quản...)
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Lưu ý cần xử lý với các mẫu nhầy: thêm 2 thể tích dung dịch 1X PBS hoặc dung dịch muối vào 1 thể tích mẫu, vortex để phân tán mẫu

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

10 µL IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic như bảng sau. IC có thể được bổ sung vào dung dịch dung giải hoặc bổ sung vào hỗn hợp mẫu bệnh phẩm và dung dịch dung giải.

b. Thực hiện phản ứng Real-time RT-PCR

- Bật thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix, cụ thể:

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

- + Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng.
- + Chia 17 µl MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

- Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.

- Thêm 8 μ l sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.
- Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.
- Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.
- Cài đặt chu trình nhiệt trên máy Real-time PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Cài đặt sơ đồ mẫu
- Chọn kênh màu: FAM, HEX, Cal Red 610 và Quasar 670
- Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương.

Lưu ý: chọn loại đĩa: BR White

- Bắt đầu chạy chương trình. Lưu file dữ liệu vào thư mục thích hợp.
- Bắt đầu quá trình chạy realtime PCR

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản, chứng âm không có bất kỳ đường đồ thị huỳnh quang nào xuất hiện

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khi quá trình Real-time PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.
- Phân tích kết quả trong phần mềm của nhà sản xuất cài đặt trên máy tính.
- Diễn giải kết quả:
 - + Kết quả dương khi giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) ≤ 42 .
 - + Kết quả âm khi giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) > 42 hoặc N/A

Kênh màu	RP1	
	Đường 1	Đường 2
FAM	RSV A	Flu A
HEX	RSV B	Flu B
Cal Red 610	Flu A-H1pdm09	Flu A-H1
Quasar 670	IC	Flu A-H3

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

374. JEV IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu với virus Viêm não Nhật Bản (*Japanese encephalitis virus* - JEV) trong huyết thanh, huyết tương hoặc dịch não tủy bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgM đặc hiệu với virus Viêm não Nhật Bản dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Nhỏ chứng và huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
7	Đậy tấm và ủ
8	Rửa
9	Nhỏ chất cộng hợp
10	Đậy tấm và ủ.
11	Rửa
12	Nhỏ dung dịch hiện màu
13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
 - + Tính giá trị trung bình của các calibrator (CO trung bình). Loại bỏ những calibrator có giá trị lớn hơn giá trị trung bình 15 % và tính lại giá trị trung bình này.

- + Yếu tố hiệu chỉnh (Correction Factor-CF): Yếu tố này thay đổi ở mỗi lô hóa chất và được in trên lọ calibrator.
- Điều kiện của phản ứng
 - + OD blank $\leq 0,15$
 - + OD chứng âm ≤ 0.25 .
 - + OD calibrator $\geq 0,25$
 - + OD chứng dương $\geq 0,5$
 - + ISR cho chứng âm, chứng dương I và chứng dương II phải nằm trong khoảng mong đợi của nhà sản xuất được in trên lọ hóa chất.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Giá trị ngưỡng (CO)

$$CO = CF \times CO \text{ trung bình}$$

- Tính tỷ số tình trạng miễn dịch (Immune Status Ratio-ISR) cho mỗi bệnh phẩm

$$ISR = OD \text{ bệnh phẩm} : OD \text{ CO}$$

- + Dương tính: nếu $ISR \geq 1.1$
- + Nghi ngờ: nếu $0.91 \leq ISR \leq 1.09 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm
- + Âm tính: nếu $ISR \leq 0.90$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ

kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

375. Measles Virus IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Tài liệu này hướng dẫn thực hiện quy trình xét nghiệm phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgG đối với virus sởi trong huyết thanh hoặc huyết tương người. Xét nghiệm Measles Virus IgG khuyến cáo để xác định trạng thái miễn dịch và xác định IgG trong dịch não tủy bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KN hoặc KT hoặc KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- Measles Virus IgM: Kháng thể IgM với Measles Virus
- Measles Virus IgG: Kháng thể IgG với Measles Virus.
- QC: Quality Control - Mẫu chứng là mẫu đã biết không có hoặc có chứa sẵn những thành phần cần phải xác định trong mẫu bệnh phẩm
- ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay): Thử nghiệm miễn dịch gắn enzyme.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm IgG/IgM kháng virus Sởi (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng

- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm IgG/IgM kháng virus Sởi (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng (đối với IgG: 1 bệnh phẩm +100 dilution buffer DILB) vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2
5	Ủ 60 phút (± 5 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
6	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
7	Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank.
8	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) trong tủ ấm.
9	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
10	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank

Các bước	Nội dung
11	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) trong tủ ấm.
12	Nhỏ 100 μl dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tăm.
13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút bằng máy đọc ELISA.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

- *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*
 - + Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*
 - + NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
 - + Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng

Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

+ Âm tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm < Khoảng giá trị ngưỡng.

+ Dương tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm > Khoảng giá trị ngưỡng.

IgG: chỉ điểm đã từng có nhiễm virus hoặc sau tiêm chủng thành công.

Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ số tỷ lệ pha loãng.

Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng.

Đối với dịch não tủy cần tiến hành lấy cùng ngày với mẫu máu và thực hiện xét nghiệm song song đồng thời.

Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định..

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

376. Measles Virus IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Tài liệu này hướng dẫn thực hiện quy trình xét nghiệm phát hiện định tính và định lượng kháng thể IgM đối với virus sởi trong huyết thanh hoặc huyết tương người. Xét nghiệm Measles Virus IgM khuyến cáo để xác định nhiễm virus cấp bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KN hoặc KT hoặc KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- Measles Virus IgM: Kháng thể IgM với Measles Virus
- Measles Virus IgG: Kháng thể IgG với Measles Virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm IgG/IgM kháng virus Sởi (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm

- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm IgG/IgM kháng virus Sởi ELISA Measles virus IgG/IgM (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Để sinh phẩm, mẫu ra ngoài tủ lạnh trong 30 phút về nhiệt độ phòng. Lắc nhẹ, đều các lọ dung dịch trước khi sử dụng, tránh tạo bọt.
2	Chuẩn bị, sắp xếp mẫu theo thứ tự, viết sơ đồ.
3	Chuẩn bị số lượng giếng theo yêu cầu đặt vào tấm nhựa đã cho sẵn.
4	Đối với IgM cần làm thêm: Hấp phụ yếu tố thấp: (pha Rf-absorbent RF (V1) + dilution buffer DILB (V2) = 1 + 4 = Rf-dilution bufer (V3) (200 µl Rf-absorbent RF + 800 µl dilution buffer DILB); pha loãng bệnh phẩm V4+V3 = 1+100 (10 µl bệnh phẩm + 1000 µl Rf-dilution buffer yếu tố thấp đã pha). Ủ bệnh phẩm đã xử lý trên 15 phút ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Nhỏ 100 µl mỗi mẫu chuẩn, mẫu chứng có sẵn, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank: A1 - substrate blank, B1 - Chứng âm (NEG), C1 - Standard serum (STD), D1- Standard serum (STD), E1 – bệnh phẩm 1, F1 – bệnh phẩm 2.
5	Ủ 60 phút (±5 phút) ở 37°C (± 1°C) trong tủ ấm.
6	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
7	Nhỏ 100 µl dung dịch Conjugate (APC) có sẵn vào mỗi giếng trừ giếng substrate blank.
8	Ủ 30 phút (±1 phút) ở 37°C(± 1°C) trong tủ ấm.
9	Rửa tấm 4 lần với 300µl/giếng bằng dung dịch rửa (WASH) đã pha loãng (1:30 với nước cất) bằng máy rửa ELISA. Thấm khô tấm bằng giấy thấm.
10	Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu Substrate pNPP có sẵn vào mỗi giếng bao gồm cả giếng substrate blank

Các bước	Nội dung
11	Ủ 30 phút (± 1 phút) ở 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) trong tủ ấm.
12	Nhỏ 100 μl dung dịch dừng phản ứng STOP vào mỗi giếng. Lắc nhẹ và đều tăm.
13	Đo mật độ quang bằng máy quang kế ở bước sóng 405 nm (Bước sóng tham khảo 620 – 690 nm ví dụ 650 nm) trong vòng 60 phút bằng máy đọc ELISA.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

- *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*
 - + Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*
 - + NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
 - + Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng

Phương pháp định tính: Xác định khoảng ranh giới (borderline range) của xét nghiệm đặc trưng cho từng mẫu chứng và cho biết khoảng giá trị ngưỡng đối với kết quả xét nghiệm này.

+ Âm tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm < Khoảng giá trị ngưỡng.

+ Dương tính: khi giá trị mẫu bệnh phẩm > Khoảng giá trị ngưỡng.

Phương pháp định lượng: Xây dựng đường cong của chuẩn theo giá trị thông số A, B, C, D định lượng các giá trị này tương ứng theo các giá trị của OD.

* Hạn chế của kỹ thuật:

Trong trường hợp mẫu cho kết quả cao hơn giới hạn trên, cần pha loãng huyết thanh ở độ cao hơn và tính kết quả dựa vào cơ số tỷ lệ pha loãng.

Thận trọng với những mẫu huyết thanh vỡ hồng cầu, mỡ máu, vàng.

Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

Trong trường hợp không xác định cần xét nghiệm song song cặp huyết thanh lấy cách nhau 1 đến 2 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.
- Kiểm tra, bảo dưỡng, vệ sinh máy định kỳ và đúng quy trình khi thực hiện xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
2. Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
3. Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

377. Measles IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định bán định lượng kháng thể IgG đặc hiệu với virus sởi trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương người. Xét nghiệm được sử dụng để hỗ trợ xác định tình trạng huyết thanh học đối với virus sởi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của công nghệ miễn dịch hóa phát quang (CLIA)

Định nghĩa: Measles IgG: Kháng thể IgG kháng Measles Virus

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Measles* IgG (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 10 ml
- Panh
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 120 phút (2 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Measles IgG* (VD hoặc tương đương).

Các bước	Nội dung
1	Tái phân tán hạt từ và tránh tạo bọt. Đặt khay thuốc thử tích hợp vào khoang thuốc thử của máy phân tích với nhãn mã vạch ở bên trái và để yên trong 30 phút trước khi sử dụng. Máy phân tích tự động khuấy và phân tán hoàn toàn hạt từ.
2	Tuân thủ Hướng dẫn sử dụng của máy phân tích để nạp mẫu và bắt đầu chạy.
3	Chuẩn và chứng thực hiện theo quy trình hướng dẫn. Hiệu chuẩn lặp lại 3 lần khi có ít nhất một trong các điều kiện sau: - Sử dụng lô thuốc thử tích hợp hoặc lô cơ chất mới. - 4 tuần kể từ lần hiệu chuẩn trước đó. - Máy xét nghiệm vừa được bảo dưỡng, can thiệp kỹ thuật. - Giá trị kiểm chứng nằm ngoài dải kỳ vọng.
4	Phân phối hạt từ và dung dịch pha loãng mẫu và mô-đun phản ứng
5	Phân phối chất hiệu chuẩn, chất kiểm chứng hoặc mẫu bệnh phẩm.
6	Ủ.
7	Rửa với Wash/System liquid.
8	Phân phối chất cộng hợp vào mô-đun phản ứng.
9	Ủ.
10	Rửa với Wash/System liquid.
11	Thêm cơ chất và đo tín hiệu ánh sáng phát ra.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
 - Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả:

- Máy xét nghiệm tự động tính toán nồng độ kháng thể IgG kháng virus sởi theo đơn vị AU/mL và phân loại kết quả.
- Dải đo của xét nghiệm: 5 đến 300 AU/mL IgG kháng virus sởi.
- Giá trị ngưỡng (cut-off) phân biệt sự có mặt/ không có mặt của kháng thể IgG kháng virus sởi là 15,0 AU/mL.
- Kết quả xét nghiệm có thể được diễn giải như sau:
 - Mẫu có nồng độ kháng thể IgG kháng virus sởi $< 13,5$ AU/mL nên được phân loại là *âm tính*.
 - Mẫu có nồng độ kháng thể IgG kháng virus sởi nằm trong dải từ 13,5 đến 16,5 AU/mL nên được phân loại là *ngghi ngờ*.
 - Mẫu có nồng độ kháng thể IgG kháng virus sởi $\geq 16,5$ AU/mL nên được phân loại là *dương tính*.

Nếu trên lâm sàng nghi ngờ có phơi nhiễm với virus sởi trong khi kết quả xét nghiệm âm tính hoặc nghi ngờ, đặc biệt các đối tượng chưa từng mắc sởi hoặc chưa được tiêm vắc xin, nên lấy mẫu lần hai và tiến hành xét nghiệm sau ít nhất một đến hai tuần sau đó.

Kết quả xét nghiệm dương tính với kháng thể IgG kháng virus sởi thường cho biết đối tượng đã từng phơi nhiễm với virus sởi trong quá khứ hoặc đã được tiêm vắc xin, qua đó cho biết đối tượng đã có miễn dịch với virus sởi. Tuy nhiên, một mẫu bệnh phẩm đơn lẻ chỉ có thể hỗ trợ đánh giá tình trạng huyết thanh học của cá thể.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể

lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Các mẫu nhiễm khuẩn hoặc đã bất hoạt bởi nhiệt có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.
- Không sử dụng hoán đổi khay thuốc thử tích hợp giữa các loại máy xét nghiệm khác nhau (LIAISON, LIAISON XL và LIAISON XS). Sau khi mở, một bộ thuốc thử tích hợp chỉ được sử dụng trên một loại máy nhất định cho đến hết.
- Chất gây nhiễu: Các nghiên cứu có đối chứng về các chất/ tình trạng có nguy cơ gây nhiễu cho thấy đặc tính hiệu năng của xét nghiệm không bị ảnh hưởng bởi các chất chống đông (kali EDTA, natri heparin); tán huyết (nồng độ hemoglobin lên đến 1000 mg/dL); mỡ máu (nồng độ triglycerid lên đến 3000 mg/dL); tăng bilirubin máu (nồng độ bilirubin lên đến 20 mg/dL), tăng albumin máu (nồng độ albumin lên đến 5,0 g/dL); hoặc tối đa 6 chu trình làm đông – rã đông mẫu. Việc sử dụng các mẫu huyết tương được chống đông bằng citrat làm giảm tín hiệu đo được, dẫn tới các kết quả bị đánh giá thấp hơn thực tế (khoảng 20%).
- Phản ứng chéo: Nghiên cứu về phản ứng chéo đối với xét nghiệm LIAISON Measles IgG được thiết kế để đánh giá nguy cơ gây nhiễu tiềm tàng từ:
 - + Kháng thể kháng các vi sinh vật gây ra triệu chứng lâm sàng tương tự với sởi (hCMV, EBV, virus rubella, parvovirus B19, virus quai bị, *Toxoplasma gondii*).
 - + Kháng thể kháng các vi sinh vật gây ra bệnh nhiễm trùng khác (HSV, VZV, HAV).
 - + Các tình trạng khác do hoạt động không điển hình của hệ miễn dịch (các tự kháng thể kháng nhân).

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định..

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

378. Measles IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định bán định lượng kháng thể IgG đặc hiệu với virus sởi trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương người. Xét nghiệm được sử dụng để hỗ trợ xác định tình trạng huyết thanh học đối với virus sởi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của công nghệ miễn dịch hóa phát quang (CLIA).

Định nghĩa: Measles IgM: Kháng thể IgM kháng Measles Virus

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Measles* IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 10 ml
- Panh
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy lý tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 120 phút (2 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm xét nghiệm *Measles* IgM (VD hoặc tương đương).

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất được ví dụ ở trên.

Các bước	Nội dung
1	Tái phân tán hạt từ và tránh tạo bọt. Đặt khay thuốc thử tích hợp vào khoang thuốc thử của máy phân tích với nhãn mã vạch ở bên trái và để yên trong 30 phút trước khi sử dụng. Máy phân tích tự động khuấy và phân tán hoàn toàn hạt từ.
2	Tuân thủ Hướng dẫn sử dụng của máy phân tích để nạp mẫu và bắt đầu chạy.
3	Chuẩn và chứng thực hiện theo quy trình hướng dẫn. Hiệu chuẩn lặp lại 3 lần khi có ít nhất một trong các điều kiện sau: - Sử dụng lô thuốc thử tích hợp hoặc lô cơ chất mới. - 4 tuần kể từ lần hiệu chuẩn trước đó. - Máy xét nghiệm vừa được bảo dưỡng, can thiệp kỹ thuật. - Giá trị kiểm chứng nằm ngoài dải kỳ vọng.
4	Phân phối chất hiệu chuẩn/ chất kiểm chứng/ mẫu bệnh phẩm vào mô-đun phản ứng.
5	Phân phối dung dịch pha loãng mẫu
6	Phân phối hạt từ.
7	Ủ.
8	Rửa với Wash/System Liquid.
9	Phân phối chất cộng hợp vào mô-đun phản ứng.
10	Ủ.
11	Rửa với Wash/System Liquid.
12	Thêm cơ chất và đo tín hiệu ánh sáng phát ra.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả:

Máy xét nghiệm tự động tính toán nồng độ kháng thể IgM kháng virus sởi theo giá trị index và phân loại kết quả. Tham khảo hướng dẫn sử dụng thiết bị để biết thông tin chi tiết.

Khi phân tích chất hiệu chuẩn và chất kiểm chứng trên máy xét nghiệm:

Dải đo của xét nghiệm: 0,5 đến 4 (index) IgM kháng virus sởi.

Giá trị ngưỡng (cut-off) phân biệt sự có mặt/ không có mặt của kháng thể IgM kháng virus sởi là 1,0 (index).

Kết quả xét nghiệm có thể được diễn giải như sau:

- Mẫu có nồng độ kháng thể IgM kháng virus sởi $< 0,9$ (index) nên được phân loại là *âm tính*.
- Mẫu có nồng độ kháng thể IgM kháng virus sởi nằm trong dải từ 0,9 đến 1,1 (index) nên được phân loại là *ngghi ngờ*.
- Mẫu có nồng độ kháng thể IgM kháng virus sởi $\geq 1,1$ (index) nên được phân loại là *dương tính*.

Giá trị ngưỡng (cut-off) phân biệt sự có mặt/ không có mặt của kháng thể IgM kháng virus sởi là 1,0 (index).

Kết quả xét nghiệm có thể được diễn giải như sau:

- Mẫu có nồng độ kháng thể IgM kháng virus sởi $< 0,9$ (index) nên được phân loại là *âm tính*.
- Mẫu có nồng độ kháng thể IgM kháng virus sởi nằm trong dải từ 0,9 đến 1,1 (index) nên được phân loại là *ngghi ngờ*.
- Mẫu có nồng độ kháng thể IgM kháng virus sởi $\geq 1,1$ (index) nên được phân loại là *dương tính*.

Một kết quả xét nghiệm âm tính thường cho biết tình trạng nhiễm virus cấp. Tuy nhiên, một kết quả xét nghiệm âm tính không phải lúc nào cũng loại trừ được khả năng mắc sởi cấp, do tình trạng nhiễm virus có thể đang trong giai đoạn rất sớm và bệnh nhân có

thể chưa có khả năng tổng hợp kháng thể IgM đặc hiệu với virus sởi. Cần lưu ý rằng xét nghiệm sẽ cho kết quả âm tính trong vài tuần đầu sau khi nhiễm virus. Nếu trên lâm sàng nghi ngờ có phơi nhiễm với virus sởi trong khi kết quả xét nghiệm âm tính, nên lấy mẫu lần hai và tiến hành xét nghiệm ít nhất một đến hai tuần sau đó.

Một kết quả xét nghiệm nghi ngờ thường cho biết tình trạng mới nhiễm virus hoặc đã từng nhiễm virus với IgM kháng virus sởi tồn tại kéo dài. Dữ liệu huyết thanh học từ các xét nghiệm phát hiện các dấu ấn bổ sung của virus sởi có thể cung cấp thêm thông tin hữu ích cho việc diễn giải kết quả trên lâm sàng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Các mẫu nhiễm khuẩn hoặc đã bất hoạt bởi nhiệt có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.
- Không sử dụng hoán đổi khay thuốc thử tích hợp giữa các loại máy xét nghiệm khác nhau. Sau khi mở, một bộ thuốc thử tích hợp chỉ được sử dụng trên một loại máy nhất định cho đến hết.
- Chất gây nhiễu: Các nghiên cứu có đối chứng về các chất/ tình trạng có nguy cơ gây nhiễu cho thấy đặc tính hiệu năng của xét nghiệm không bị ảnh hưởng bởi các chất chống đông (kali EDTA, natri heparin); tán huyết (nồng độ hemoglobin lên đến 1000 mg/dL); mỡ máu (nồng độ triglycerid lên đến 3000 mg/dL); tăng bilirubin máu (nồng độ bilirubin lên đến 20 mg/dL), tăng albumin máu (nồng độ albumin lên đến 5,0 g/dL); hoặc tối đa 6 chu trình làm đông – rã đông mẫu. Việc sử dụng các mẫu huyết tương được chống đông bằng citrat làm giảm tín hiệu đo được, dẫn tới các kết quả bị đánh giá thấp hơn thực tế (khoảng 20%).
- Phản ứng chéo: Nghiên cứu về phản ứng chéo đối với xét nghiệm Measles IgG được thiết kế để đánh giá nguy cơ gây nhiễu tiềm tàng từ:
 - + Kháng thể kháng các vi sinh vật gây ra triệu chứng lâm sàng tương tự với sởi (hCMV, EBV, virus rubella, parvovirus B19, virus quai bị, *Toxoplasma gondii*).
 - + Kháng thể kháng các vi sinh vật gây ra bệnh nhiễm trùng khác (HSV, VZV, HAV).

- + Các tình trạng khác do hoạt động không điển hình của hệ miễn dịch (các tự kháng thể kháng nhân).

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

379. Measles virus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện sự có mặt của Measles virus trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của Measles virus được khuếch đại và phát hiện bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR sử dụng cặp môi và probe đặc hiệu. Sự có mặt của Measles ARN được xác định dựa trên đường đồ thị huỳnh quang của phản ứng Real-time PCR.

Định nghĩa

- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên tục
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng

- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy Real-time PCR
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: dịch ty hầu, dịch ngoáy họng hoặc nước tiểu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu Measles virus chuẩn hoặc Measles virus dương tính đã được xác định. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình PCR được thực hiện đúng; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống master mix trong kit sinh phẩm sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.

- Chia Master Mix vào mỗi ống phản ứng PCR (thể tích tùy theo loại sinh phẩm sử dụng):

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25
2	MgCl ₂ (25 mM)	4
3	Mồi xuôi	2
4	Mồi ngược	2
5	Probe huỳnh quang	1
6	H ₂ O	11
7	DRA khuôn	5
8	Tổng thể tích	50

Quy trình PCR

- Chuyển sản phẩm tách chiết ARN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ARN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	95	5 phút	1
2	95	20 giây	45
	60	1 phút (đọc huỳnh quang)	
3	10	5 phút	1

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Thực hiện phân tích kết quả theo hướng dẫn của loại sinh phẩm hóa chất đang sử dụng.
- Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.
- Chứng âm không có đường huỳnh quang nào xuất hiện hoặc xuất hiện đồ thị huỳnh quang dưới đường giới hạn cơ bản.
- Chứng nội tại phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.
- Đường đồ thị huỳnh quang của mẫu có thể xuất hiện hoặc không xuất hiện trên đường giới hạn, căn cứ vào đó để kết luận kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm: Nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách, phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy
- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có đồ thị huỳnh quang, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có đồ thị huỳnh quang, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có đồ thị huỳnh quang, mẫu chứng âm không có đồ thị huỳnh quang, kết quả đó sẽ được sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn, thực hiện đúng quy định ở mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

380. Norovirus test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên Norovirus Genogroup I (GI) và Genogroup II (GII) trong mẫu phân người bằng kỹ thuật test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch

Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng

Dung dịch sát khuẩn tay nhanh

Còn 70%

Dung dịch nước rửa tay

Dung dịch khử trùng

Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng

Khay đựng bệnh phẩm

Hộp vận chuyển bệnh phẩm

Đồng hồ bấm giây

Panh

Giấy thấm

Mũ giấy

Khẩu trang

Găng khám

Găng tay xử lý dụng cụ

Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý

Áo choàng phòng xét nghiệm

Khăn lau tay

Máy ly tâm thường

Tủ lạnh 2°C – 8°C

Đồng hồ bấm giờ

Tủ an toàn sinh học cấp II

Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Loại bệnh phẩm: Mẫu phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.

Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đưa test cần làm để ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi làm. Lấy thanh xét nghiệm cần thiết.
2	Lấy dung môi đến vạch và chuyển dung môi sang ống đựng mẫu. Hút dung môi 2 lần theo hướng dẫn
3	Lấy khoảng 50 - 100 mg phân bằng que tăm bông vô trùng nhúng vào ống nghiệm có chứa dung dịch pha loãng.

Các bước	Nội dung
4	Xoay tròn que tăm bông để bệnh phẩm hoà vào dung dịch pha loãng ít nhất 10 lần theo hướng dẫn.
5	Đậy nắp ống nghiệm đã có bệnh phẩm lại.
6	Nhỏ dung dịch bệnh phẩm đã pha loãng vào giếng nhỏ bệnh phẩm (có chữ S).
7	Đọc kết quả sau 15 phút. Quá 15 phút, kết quả không có giá trị.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch Chứng

4.2.2 Đọc kết quả:

Âm tính: Chỉ có 1 vạch màu xuất hiện ở vùng chứng.

Dương tính: 2 vạch màu, xuất hiện ở vùng chứng và vùng thử nghiệm.

Không có giá trị: Không thấy xuất hiện vạch màu tại vùng chứng. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi: Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

381. Rotavirus test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên Rotavirus trong bệnh phẩm phân bằng kỹ thuật test nhanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm sắc ký miễn dịch
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Đồng hồ bấm giây
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý

- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu máu được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đưa test cần làm để ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi làm. Lấy thanh xét nghiệm cần thiết.
2	Hút hút dung dịch pha loãng bệnh phẩm theo hướng dẫn
3	Lấy khoảng 50 mg phân bằng que tăm bông vô trùng nhúng vào ống nghiệm có chứa dung dịch pha loãng.

Các bước	Nội dung
4	Xoay tròn que tăm bông để bệnh phẩm hoà vào dung dịch pha loãng theo hướng dẫn.
5	Đẩy nắp ống nghiệm đã có bệnh phẩm lại.
6	Nhỏ dung dịch bệnh phẩm đã pha loãng vào giếng nhỏ bệnh phẩm (có chữ S).
7	Đọc kết quả sau 10-20 phút. Quá 20 phút, kết quả không có giá trị.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch Chứng

4.2.2 Đọc kết quả:

- Âm tính: Chỉ có 1 vạch màu xuất hiện ở vùng chứng.
- Dương tính: 2 vạch màu, xuất hiện ở vùng chứng và vùng thử nghiệm.
- Không có giá trị: Không thấy xuất hiện vạch màu tại vùng chứng. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi: Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

382. Rotavirus Ag miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng nguyên của vi rút Rota trong mẫu bệnh phẩm phân của người bệnh

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng thể để phát hiện kháng nguyên của vi rút Rota

Ở lần ủ thứ nhất, nếu trong mẫu phân của người bệnh có kháng nguyên của vi rút Rota sẽ kết hợp với các kháng thể vi rút Rota được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng thể – kháng nguyên. Ở lần ủ thứ 2, kháng thể kháng của vi rút Rota được thêm vào sẽ kết hợp với phức hợp được tạo ra ở lần ủ thứ nhất. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng thể - kháng nguyên - kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng nguyên đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch enzyme phát hiện kháng nguyên Rotavirus trong phân.
- Bộ sinh phẩm xác định kháng nguyên Rotavirus bao gồm:
 - + Vi giếng phủ kháng thể đặc hiệu
 - + Mẫu chứng, mẫu chuẩn
 - + Dung dịch pha loãng mẫu
 - + Dung dịch rửa đậm đặc
 - + Kháng thể kháng Rotavirus
 - + Kháng thể gắn enzyme
 - + Cơ chất/ chất tạo màu
 - + Dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh

- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) 10µl -200 µl tiệt trùng
- Đầu côn (tip) 1000 µl tiệt trùng
- Ống eppendoff 1-1,5ml
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Chai thuỷ tinh Duran
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sỹ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA bán tự động bao gồm:
- Máy ủ (khoảng nhiệt độ $35 \pm 20^{\circ}\text{C}$),
- Máy rửa khay vi giếng 8 x 12 hàng
- Máy đọc, bước sóng 405nm – 630nm
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy vortex để trộn các hoá chất, và trộn đều mẫu khi pha loãng
- Bộ pipette tự động các kích cỡ từ 10µl đến 1000µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Tủ lạnh 2°C - 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.

- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu phân tươi của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu bệnh phẩm phân phải được lấy vào lọ nhựa sạch, khô, không lấy lẫn nước tiểu.
 - + Thể tích mẫu phân ít nhất khoảng bằng 1 hạt lạc với phân rắn, và khoảng 2-5ml với phân lỏng.
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 giờ (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy trình của phòng xét nghiệm

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Đánh số bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số sinh phẩm cần thực hiện gắn vào giá đỡ
5	Pha loãng mẫu phân, trộn đều và để lắng cặn.
6	Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và dịch nổi của mẫu đã để lắng cặn vào giếng
7	Đậy và ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp
8	Rửa giếng loại bỏ thành phần thừa

Các bước	Nội dung
9	Thêm kháng thể kháng rotavirus vào các giếng theo quy định
10	Đậy và ủ giếng lần thứ hai
11	Rửa giếng
12	Nhỏ kháng thể gắn enzym vào các giếng theo quy định
13	Ủ giếng lần thứ ba
14	Rửa giếng
15	Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng
16	Ủ giếng lần thứ tư (lưu ý tránh ánh sáng)
17	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
18	Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng
19	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh độ hấp phụ quang đo được của bệnh phẩm với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 3-5 ngày

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Tắc kim máy rửa, dẫn đến rửa bẩn. - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Máy ủ không đạt nhiệt độ yêu cầu. + Máy đo quang bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sỹ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

383. RSV Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể kháng vi rút hợp bào hô hấp (Respiratory Syncytial Virus -RSV) trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể kháng RSV

Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể kháng RSV sẽ kết hợp với các kháng nguyên RSV được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể kháng RSV
- Bộ sinh phẩm xác định kháng thể kháng RSV bao gồm:
 - + Vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu
 - + Mẫu chứng, mẫu chuẩn
 - + Dung dịch pha loãng mẫu
 - + Dung dịch rửa đậm đặc
 - + Kháng thể gắn enzyme
 - + Cơ chất/ chất tạo màu
 - + Dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Đầu côn (tip) 10µl-200 µl tiệt trùng

- Đầu côn (tip) 1000 μ l tiệt trùng
- Ống nghiệm nhựa 3-5ml không nắp
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Chai thủy tinh Duran
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sỹ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy ELISA bán tự động bao gồm:
 - Máy ủ (khoảng nhiệt độ $35 \pm 20^\circ\text{C}$),
 - Máy rửa khay vi giếng 8 x 12 hàng
 - Máy đọc, bước sóng 405nm – 630nm
 - Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
 - Máy vortex để trộn các hoá chất, và trộn đều mẫu khi pha loãng
 - Bộ pipette tự động các kích cỡ từ 10 μ l đến 1000 μ l
 - Bộ pipetman 8 kênh
 - Tủ lạnh $2^\circ\text{C} - 8^\circ\text{C}$ bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
 - Tủ âm sâu -20° lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
 - Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
 - Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
 - Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy định tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:

- + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1ml.
- + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố $< 2.0 \text{ g/L}$, lipid/triglyceride $< 11.5 \text{ g/L}$, bilirubin $< 0.201 \text{ g/L}$
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy trình của phòng xét nghiệm

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số sinh phẩm cần thực hiện gắn vào giá đỡ
5	Pha loãng bệnh phẩm
6	Nhỏ chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng
7	Đậy và ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp
8	Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa
9	Nhỏ dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzyme) vào các giếng
10	Đậy và ủ giếng lần thứ hai
11	Rửa giếng

Các bước	Nội dung
12	Nhỏ dung dịch cơ chất vào các giếng
13	Ủ giếng lần thứ 3 (lưu ý tránh ánh sáng)
14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
15	Đo độ hấp phụ của các giếng sau khi dừng phản ứng
16	Nhập kết quả đo được vào phần mềm tính toán theo hướng dẫn của nhà sản xuất
17	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định

+ Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Tắc kim máy rửa, dẫn đến rửa bẩn. - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Máy ủ không đạt nhiệt độ yêu cầu. + Máy đo quang bị hỏng.	- Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sỹ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

384. RSV Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của RSV (*Respiratory syncytial virus*) trong bệnh phẩm đường hô hấp bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm dựa trên công nghệ MuDT™ (Công nghệ phát hiện đa đích) và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch hầu họng, dịch ty hầu, dịch súc họng, các loại dịch đường hô hấp dưới (đờm, dịch phế quản...)
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Lưu ý cần xử lý với các mẫu nhầy: thêm 2 thể tích dung dịch 1X PBS hoặc dung dịch muối vào 1 thể tích mẫu, vortex để phân tán mẫu

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết RNA tổng số

10 µL IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic như bảng sau. IC có thể được bổ sung vào dung dịch dung giải hoặc bổ sung vào hỗn hợp mẫu bệnh phẩm và dung dịch dung giải.

b. Thực hiện phản ứng Real-time RT-PCR

- Bật thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix, cụ thể:

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

- + Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng.
- + Chia 17 µl MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

- Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.

- Thêm 8 µl sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.
- Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.
- Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.
- Cài đặt chu trình nhiệt trên máy Real-time PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Cài đặt sơ đồ mẫu
- Chọn kênh màu: FAM, HEX, Cal Red 610 và Quasar 670
- Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương.

Lưu ý: chọn loại đĩa: BR White

- Bắt đầu chạy chương trình. Lưu file dữ liệu vào thư mục thích hợp.
- Bắt đầu quá trình chạy realtime PCR

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản, chứng âm không có bất kỳ đường đồ thị huỳnh quang nào xuất hiện

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khi quá trình Real-time PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.
- Phân tích kết quả trong phần mềm của nhà sản xuất cài đặt trên máy tính.
- Diễn giải kết quả:
 - + Kết quả dương khi giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) ≤ 42 .
 - + Kết quả âm khi giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) > 42 hoặc N/A

Kênh màu	RP1	
	Đường 1	Đường 2
FAM	RSV A	Flu A
HEX	RSV B	Flu B
Cal Red 610	Flu A-H1pdm09	Flu A-H1
Quasar 670	IC	Flu A-H3

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

385. Rubella virus Ab test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính nhanh kháng thể IgM/IgG kháng Rubella virus trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

Định nghĩa:

- IgM: Kháng thể IgM.
- IgG: Kháng thể IgG..

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Rubella IgG/IgM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 200ul
- Đầu côn 1000ul
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm vô trùng
- Bông tiêm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Đồng hồ bấm giây
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu huyết thanh, huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định .

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Cơ sở khám bệnh chữa bệnh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên bệnh nhân trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Dùng mỗi pipet mao quản 5 μ l, hút 5 μ l mẫu huyết thanh hoặc huyết tương và nhỏ vào giếng mẫu hình vuông “S”.
- Nhỏ 3-4 giọt (khoảng 90-120 μ l) dung môi thử nghiệm vào giếng dung môi hình tròn.
- Đọc kết quả trong khoảng 20 - 30 phút. Không được đọc kết quả sau 30 phút.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Chỉ đọc kết quả khi có vạch C (Control).

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc kết quả:

Ghi kết quả như bảng sau:

Hiện tượng	Kết quả
Xuất hiện 2 vạch màu ở vùng C và vùng M	IgM Dương tính
Xuất hiện 2 vạch màu ở vùng C và vùng G	IgG Dương tính
Xuất hiện 3 vạch màu ở vùng C, vùng M và vùng G	IgM Dương tính/IgG Dương tính
Xuất hiện 1 vạch màu ở vùng C	Âm tính
Không có vạch màu nào	Không có giá trị

Lưu ý: Nếu vạch control C không chuyển màu chứng tỏ test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn $\Rightarrow$ Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng. Với mục đích chẩn đoán, kết quả luôn cần được đánh giá phối hợp tiền sử, lâm sàng và nhiều bằng chứng khác trên bệnh nhân.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

386. Rubella virus IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng Rubella virus trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA. Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: Rubella virus IgM: Kháng thể IgM kháng Rubella virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Rubella IgM ELISA
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (- 20°C hoặc - 70°C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10µl đến 1000µl.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Rubella IgM ELISA

Các bước	Nội dung
1.	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3.	Chuẩn bị dung dịch rửa
4.	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
5.	Chuẩn bị dung dịch cộng hợp
6.	Pha loãng chứng và bệnh phẩm với dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:21
7.	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
8.	Đậy nắp và ủ
9.	Rửa phiên nhựa.
10.	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
11.	Đậy nắp và ủ
12.	Rửa phiên nhựa
13.	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14.	Ủ, không đậy nắp và tránh ánh sáng
15.	Dừng phản ứng.
16.	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tính giá trị ngưỡng (CO):

$CO = \text{Trung bình cộng của các chứng ngưỡng (OD R4)}$

b. Tính tỷ số mẫu bệnh phẩm: Tỷ số bệnh phẩm = OD bệnh phẩm/CO

c. Điều kiện của phản ứng:

- $CO \geq 0,3$
- $0,8 \times CO < OD R4 \leq 1,2 \times CO$

- (OD của mỗi giá trị R4 phải nhỏ hơn 20 % giá trị CO)
- ODchúng âm (R3)/CO $\leq 0,3$
- ODchúng dương (R5)/CO $\geq 1,5$

Nếu các chỉ số kiểm tra chất lượng không đáp ứng các điều kiện trên thì phải làm lại xét nghiệm.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- + Âm tính: Tỷ số bệnh phẩm $< 0,8$
- + Nghi ngờ: $0,8 \leq$ tỷ số bệnh phẩm $< 1 \rightarrow$ Yêu cầu làm lại xét nghiệm sau 3 tuần với một mẫu bệnh phẩm khác.
- + Dương tính: tỷ số bệnh phẩm ≥ 1

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dung dịch phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Tuân thủ đúng qui trình xét nghiệm.

- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

387. Rubella virus IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định nồng độ kháng thể IgG kháng Rubella virus trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA. Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: *Rubella virus IgG*: Kháng thể IgG kháng Rubella virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Rubella IgG ELISA
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (- 20°C hoặc - 70°C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10µl đến 1000µl.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Rubella IgG ELISA

Các bước	Nội dung
1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa
4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
5	Pha loãng chứng và bệnh phẩm với dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:21
6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh bệnh nhân đã pha loãng
7	Đậy nắp và ủ
8	Chuẩn bị dung dịch cộng hợp
9	Rửa phiên nhựa.
10	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
11	Đậy nắp và ủ
12	Rửa phiên nhựa
13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ, không đậy nắp và tránh ánh sáng
15	Dừng phản ứng.
16	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

a. Xây dựng đường cong chuẩn

- Sự xuất hiện và nồng độ của kháng thể Rubella IgG có trong mẫu bệnh phẩm sẽ được xác định bằng cách so sánh độ hấp thụ của mẫu bệnh phẩm với nồng độ tính theo Đơn vị quốc tế (IU/ml) của các giá trị ngưỡng của đường cong chuẩn theo tiêu chuẩn của WHO RUBI 1-94.
- Vẽ đường cong chuẩn:
 - + Trục tung (Y): Chấm các giá trị OD của R3, R4a, R4b, R4c.
 - + Trục hoành (X): Chấm các điểm biểu thị các giá trị nồng độ tương ứng của R3, R4a, R4b, R4c (IU/ml)

- Đối với mỗi mẫu bệnh phẩm, tính hiệu giá kháng thể Rubella IgG bằng cách xác định nồng độ tương ứng từ đường cong chuẩn vẽ được với độ hấp thụ đo được.

b. Điều kiện của phản ứng

- OD chứng ngưỡng 15 (R4a) $\geq 0,2$
- OD chứng ngưỡng 60 (R4b) $\geq 0,4$
- ODR4a/OD R3 (chứng ngưỡng 0) $\geq 0,5$
- ODR4b/OD R4a $\geq 1,5$
- OD chứng ngưỡng 200 (R4c)/OD R4b $\geq 1,2$

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Âm tính: nếu hiệu giá < 10 IU/ml
- Nghi ngờ: nếu $10 \text{ IU/ml} \leq \text{hiệu giá} < 15 \text{ IU/ml}$
- Dương tính: nếu hiệu giá $\geq 15 \text{ IU/ml}$

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm

- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Tuân thủ đúng qui trình xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

388. Rubella virus IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng Rubella virus trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật miễn dịch tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang “ECLIA”. Dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KKT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

Định nghĩa:

- Rubella virus IgM: Kháng thể IgM kháng Rubella virus.
- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng.
- Sample Cups: Cốc đựng mẫu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ Vi sinh /Bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Rubella IgM
- Sinh phẩm chân đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Nước cất
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn 200 μ L - tiệt trùng

- Đầu cân 1000 μL - tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm nhựa 10 ml
- Panh
- Dây garô
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Tủ âm sâu ($- 20^{\circ}\text{C}$ hoặc $- 70^{\circ}\text{C}$) (nếu có)
- Micropipette.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút (1 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất được ví dụ ở trên.

Các bước	Nội dung
1	Vào Reagent để kiểm tra Số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
3	Chạy chúng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1.	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
2.	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3.	Nhập mã bệnh phẩm
4.	Chọn tên test là Rubella IgM
5.	Vào Barcode Read Error
6.	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7.	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
8.	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

a. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

b. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Âm tính: Nếu $COI < 0.80$
- Nghi ngờ: Nếu $0.80 \leq COI < 1.0 \rightarrow$ cần phải kiểm tra lại
- Dương tính: Nếu $COI \geq 1.0$:

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ) $\rightarrow$ Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

389. Rubella virus IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định nồng độ kháng thể IgG kháng Rubella virus trong huyết thanh hoặc huyết tương kỹ thuật miễn dịch tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang “ECLIA”. Dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KKT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

Định nghĩa: Rubella virus IgG: Kháng thể IgG kháng Rubella virus.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ Vi Sinh /Bác sĩ Xét nghiệm /Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Rubella IgG
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (- 20°C hoặc - 70°C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 50 µl đến 200 µl..

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút (1 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất được ví dụ ở trên.

Các bước	Nội dung
1	Vào Reagent để kiểm tra Số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
9.	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
10.	Vào màn hình Workplace → Test Selection
11.	Nhập mã bệnh phẩm
12.	Chọn tên test là Rubella IgG
13.	Vào Barcode Read Error
14.	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
15.	Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
16.	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

a. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

b. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Âm tính: Nếu COI < 10 IU/ml
- Dương tính: Nếu COI ≥ 10 IU/ml

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ)→ Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng)

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

390. Rubella virus PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của Rubella virus trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật Polymerase chain reaction (PCR).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ARN đặc trưng của Rubella virus được sao chép ngược bằng phản ứng RT, sau đó khuếch đại bằng phản ứng PCR. Sự có mặt của Rubella virus được xác định bằng cách so sánh kích thước của sản phẩm PCR với thang ADN chuẩn trên gel agarose điện di.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction): Phản ứng kép gồm phiên mã ngược ARN thành ADN tiếp theo phản ứng PCR
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng

- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiết trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy PCR và hệ thống máy vi tính
- Mát tách chiết tự động
- Máy điện di
- Máy đọc gel
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g

- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Máy ly tâm spill-down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (- 20°C hoặc - 70°C)
- Micropipettes các thể tích từ 5-1000µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu, dịch ối, gai nhau, nước tiểu, các loại dịch tiết đường hô hấp (đờm, dịch tỵ hầu, dịch phế quản, mũi, ngoáy hầu họng...)
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm và đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Trên phiếu chỉ định xét nghiệm phải bao gồm loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có)

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tách chiết RNA

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng chủng Rubella virus chuẩn hoặc chủng Rubella virus đã được định danh. Tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ARN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit PCR Master Mix và các ống môi, sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa RNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	OneStep RT-PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	ARN khuôn	10.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR:

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết ARN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ARN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	55	30 phút	1
2	95	5 phút	1
3	95	20 giây	38
	56	30 giây	
	72	1 phút	
4	72	15 phút	1
5	4	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 oC và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 µl sản phẩm PCR + 1.5 µl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Dương tính: Băng (band) điện di sản phẩm PCR của mẫu có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Âm tính: Sản phẩm PCR của mẫu không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.
- Kết quả không được chấp nhận: Khi chứng âm có băng điện di tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương, hoặc chứng dương không có băng hoặc có băng điện di nhưng kích thước không tương ứng với sản phẩm PCR của chứng dương và thang ADN chuẩn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ARN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẫu PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có sản phẩm PCR, thì có thể kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm và chứng NTC đều có sản phẩm PCR, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương có sản phẩm PCR, mẫu chứng âm và mẫu NTC không có sản phẩm, thì kết quả đó sẽ được sử dụng để xác định trình tự.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

391. Rubella virus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của virus Rubella trong huyết tương, huyết thanh, máu cuống rốn, tã, bông (dịch mũi, dịch họng), nước ối, mẫu mô bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR, là phản ứng PCR trong đó phân tử RNA được phiên mã ngược tạo cDNA và kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml

- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy PCR
- Bộ lưu điện
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (- 20°C hoặc - 70°C)
- Micropipette

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết tương, huyết thanh, máu cuống rốn, tã bông (dịch mũi, dịch họng), nước ối, mẫu mô.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Huyết tương từ máu ngoại vi hay máu cuống rốn. Máu được thu nhận bằng ống chống đông EDTA ở các bệnh nhân nhịn ăn qua đêm hay tối thiểu 3 tiếng sau khi bệnh nhân ăn. Lắc đảo ống nhiều lần để đảm bảo máu và chất chống đông trộn đều vào nhau. Ly tâm ống máu từ 800 – 1600g trong vòng 20 phút ở nhiệt độ phòng. Hút 1 ml huyết tương và chuyển vào ống eppendorf 2 ml vô trùng.
- Nước bọt. Thu 0,2 – 1 ml nước bọt vào ống eppendorf 1,5 ml. Yêu cầu bệnh nhân súc miệng 3 lần trước khi lấy mẫu.
- Mẫu phết họng, sử dụng tăm bông để lấy mẫu vùng hầu họng. Yêu cầu bệnh nhân súc miệng trước khi lấy mẫu. Sau khi lấy mẫu, đầu tăm bông phải được bảo quản trong ống vô trùng có chứa 500 µl môi trường vận chuyển.
- Nước ối. Cần lấy nước ối trong suốt thông qua quá trình chọc ối bằng quy trình chuẩn thu nhận vào ống eppendorf vô trùng. Sau đó trộn đều mẫu đã được thu nhận và chuyển 1 ml sang ống vô trùng mới. Ly tâm ống ở 8000 – 9000 g trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi và để lại 200 µl dịch nổi. Dùng đầu tip vô trùng có lọc để trộn đều mẫu còn lại trong eppendorf.
- Dịch rửa phế quản, khí quản: ly tâm 2000 g trong 10 – 15 phút, Nếu chưa thấy xuất hiện cặn thì thêm 10 ml dịch và lặp lại quá trình ly tâm. Loại bỏ dịch nổi và hòa tan lại cặn trong 100 µl nước muối sinh lý.
- Mẫu mô. Đồng nhất mẫu mô và hoà vào PBS vô trùng. Mẫu có thể được lưu trữ từ 2 – 80C trong thời gian không quá 12h hoặc đông lạnh từ -20⁰C đến -80⁰C.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Thêm 10 µl IC trực tiếp vào hỗn hợp mẫu/ ly giải trong quá trình tách chiết RNA.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Sử dụng ống eppendorf vô trùng để pha theo bảng hướng dẫn:

STT	Thành phần	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)	Thể tích cho N phản ứng (μl)
1	RT-PCR-mix-1-TM	10	10*N
2	RT-PCR-mix-2-TM	5	5,0*N
3	TaqF DNA Polymerase	0,5	0,5*N
4	M-MLV Revertase	0,25	0,25*N
5	RT-G-mix-2	0,25	0,25*N
	Thể tích MMX/ống phản ứng	15,0	15*N

Vortec và ly tâm ống MMX khoảng 2-3 giây.

- Chuẩn bị đủ ống phản ứng cho mẫu và các chứng, đánh dấu vị trí mẫu.
- Chia 15 μl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.
- * *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.
- Thêm 10 μl RNA đã tách chiết vào ống tương ứng. Trộn đều.
- Thêm 10 μl RNA - buffer vào ống chứng âm (NC)
- Thêm 10 μl Leptospira cDNA Pos & IC Pos vào ống chứng dương (PC)
- Đóng nắp và chuyển các ống vào máy Real time theo sơ đồ vị trí mẫu.
- Chọn màu FAM, HEX cho mẫu, chứng dương và chứng âm (FAM: phát hiện trình tự chứng nội, HEX: phát hiện cDNA của Rubella).
- Cài đặt chương trình “**Protocol**” cho máy realtime PCR hoạt động (tùy theo máy realtime PCR sử dụng để cài đặt chu trình nhiệt phù hợp)

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

- Lưu file dữ liệu vào máy tính.
- Cho máy realtime PCR chạy chương trình

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.
 - + Chứng âm: đường ngưỡng không vượt quá tín hiệu nền.
 - + Chứng dương và IC đạt yêu cầu: giá trị $Ct \leq 35$.
 - + Nếu các mẫu chứng không đạt kết quả như mong đợi cần chạy lại toàn bộ mẫu và đối chứng từ bước tách chiết.
- Các trường hợp cần kiểm tra lại:
 - + Chứng âm hiển thị đường biểu diễn dương tính.
 - + Chứng dương hiển thị đường biểu diễn âm tính.
 - + Chứng nội (IC) và mẫu xét nghiệm cùng hiển thị đường biểu diễn âm tính.
 - + Những trường hợp có giá trị Ct của mẫu xét nghiệm vượt quá giá trị kết luận dương tính.

4.2.2. Đọc kết quả

- Sản phẩm khuếch đại của cDNA Rubella virus được phát hiện trên kênh JOE/Yellow/HEX với độ nhạy 400 copies/ml. Sản phẩm khuếch đại IC được phát hiện trên kênh FAM/Green.
- Kết quả phân tích được chấp nhận là hợp lý nếu kết quả thu được của chứng dương và chứng âm của quá trình tách chiết và khuếch đại chính xác.

Có các trường hợp sau:

- + Mẫu được xem xét là dương tính khi giá trị Ct được xác định trên kênh JOE/Yellow/HEX không vượt quá giá trị Ct ngưỡng (< 40 với các mẫu lâm sàng) và giá trị Ct được xác định trên kênh FAM/Green không được vượt quá giá trị IC ($Ct < 35$). Đường tín hiệu huỳnh quang phải có dạng hàm mũ tiêu chuẩn.
- + Mẫu được xem xét là âm tính khi giá trị Ct trên kênh JOE/Yellow/HEX không được xác định (đường tín hiệu huỳnh quang không cắt đường ngưỡng) và giá trị Ct trên kênh FAM/Green được xác định và không vượt quá giá trị cụ thể của chứng nội ($Ct < 35$).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể

lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm.

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo. Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - + Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - + Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - + Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - + Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

392. VZV IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgM kháng Varicella-zoster virus trong huyết thanh/ huyết tương của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgM kháng Varicella-zoster virus.

Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgM kháng Varicella-zoster virus sẽ kết hợp với các kháng nguyên Varicella-zoster virus được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgM gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được đo bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgM kháng Varicella-zoster virus.
- Bộ sinh phẩm xác định kháng thể IgM kháng Varicella-zoster virus bao gồm:
 - + Vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu
 - + Mẫu chứng, mẫu chuẩn
 - + Dung dịch pha loãng mẫu
 - + Dung dịch rửa đậm đặc
 - + Kháng thể gắn enzyme
 - + Cơ chất/ chất tạo màu
 - + Dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay

- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- Khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sỹ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C- 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả.
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau 3- 5 ngày.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sỹ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

393. VZV IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch xác định kháng thể IgG kháng Varicella-zoster virus trong huyết thanh/ huyết tương của người

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch sử dụng kháng nguyên để phát hiện kháng thể IgG kháng Varicella-zoster virus.

Nếu trong huyết thanh, huyết tương của người bệnh có kháng thể IgG kháng Varicella-zoster virus sẽ kết hợp với các kháng nguyên Varicella-zoster virus được phủ ở đáy giếng tạo phức hợp kháng nguyên - kháng thể. Sau khi rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết, kháng thể kháng IgG gắn enzyme được thêm vào sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Cơ chất không màu được cho vào sẽ phản ứng với cộng hợp enzyme tạo ra sản phẩm có màu. Cường độ màu tỉ lệ với nồng độ kháng thể đặc hiệu liên kết và được định lượng bằng phương pháp đo quang.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất miễn dịch gắn enzyme phát hiện kháng thể IgG kháng Varicella-zoster virus.
- Bộ sinh phẩm xác định kháng thể IgG kháng Varicella-zoster virus bao gồm:
 - + Vi giếng phủ kháng nguyên đặc hiệu
 - + Mẫu chứng, mẫu chuẩn
 - + Dung dịch pha loãng mẫu
 - + Dung dịch rửa đậm đặc
 - + Kháng thể gắn enzyme
 - + Cơ chất/ chất tạo màu
 - + Dung dịch dừng phản ứng
- Tiêu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần tiệt trùng (pha loãng dung dịch rửa)
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay

- Đầu côn (tip) hút mẫu phù hợp với máy
- Đầu côn (tip) hút thuốc thử phù hợp với máy
- Khay nhựa 96 giếng để pha loãng mẫu
- Tiêu hao vật tư cho kiểm tra chất lượng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Kính lọc mật độ quang của buồng đo quang
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bảo hộ Bác sỹ/ Kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (2 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay/ giấy lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Tủ lạnh 2°C- 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Tủ âm sâu -20°C lưu mẫu bệnh phẩm, mẫu chứng, mẫu chuẩn
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh hoặc có chất chống đông phù hợp theo hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm, hóa chất. Thể tích mẫu tối thiểu 1,5ml.
 - + Mẫu có nồng độ huyết sắc tố < 2.0 g/L, lipid/triglyceride <11.5 g/L, bilirubin <0.201g/L
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ thông tin theo quy định.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Khoa xét nghiệm vi sinh/ Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn sử dụng máy

Các bước	Nội dung
1	Đưa số lượng sinh phẩm cần dùng về nhiệt độ phòng với khoảng thời gian theo khuyến cáo của nhà sản xuất trước khi thực hiện xét nghiệm
2	Chuẩn bị dung dịch rửa
3	Đặt sinh phẩm hoá chất vào giá đỡ hoá chất trên máy xét nghiệm
4	Đặt các mẫu bệnh phẩm sau khi đã xử lý vào giá đỡ mẫu bệnh phẩm trên máy xét nghiệm
5	Lấy đủ số sinh phẩm, hóa chất và vật tư cần thực hiện đưa vào buồng máy
6	Máy tự động thực hiện xét nghiệm theo các bước với thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như sau: - Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng mẫu - Thêm chất chuẩn, chất chứng và mẫu đã pha loãng vào giếng theo quy định - Ủ giếng lần thứ nhất với khoảng nhiệt độ và thời gian theo quy định để kháng nguyên và kháng thể bắt cặp - Rửa giếng, loại bỏ thành phần thừa - Thêm dung dịch cộng hợp (kháng thể gắn enzym) vào các giếng - Ủ giếng lần thứ hai - Rửa giếng - Thêm dung dịch cơ chất/ chất tạo màu vào các giếng - Ủ giếng lần thứ ba (tại buồng ủ tối) - Nhỏ dung dịch dừng phản ứng - Đo độ hấp phụ của các mẫu sau khi dừng phản ứng
7	Máy phân tích tự động tính toán nồng độ kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất
8	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

Kết quả người bệnh được chấp nhận khi giá trị mẫu chứng âm và mẫu chứng dương thực hiện cùng điều kiện đều đạt yêu cầu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- So sánh kết quả nồng độ kháng thể trong mẫu người bệnh với khoảng giá trị tham chiếu của nhà sản xuất để xem xét, phiên giải và báo cáo kết quả:
 - + Dương tính
 - + Hoặc Âm tính
 - + Hoặc Chưa xác định
- Với các kết quả “chưa xác định” khuyến cáo:
 - + Xét nghiệm lặp lại hoặc xét nghiệm lại bằng phương pháp khác.
 - + Nếu kết quả lặp lại vẫn chưa xác định, khuyến cáo lấy mẫu làm lại xét nghiệm sau khoảng 1-2 tuần

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả bằng bản điện tử và/hoặc bản giấy theo quy trình trả kết quả và lưu hồ sơ theo quy định của đơn vị.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Phản ứng dương tính giả trong các trường hợp: + Nhiễm chéo với các mẫu bệnh phẩm thử nghiệm. + Dung dịch cơ chất và/hoặc dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn. + Bộ phận rửa của máy bị hỏng - Phản ứng âm tính giả trong trường hợp: + Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn. + Buồng ủ hoặc bộ phận đo quang của máy bị hỏng.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Nhân viên thực hiện phải được đào tạo kỹ thuật đúng quy định - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo trang thiết bị được theo dõi, vệ sinh, bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ theo đúng quy định.

SAI SÓT	XỬ TRÍ
- Đọc, nhận định, phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn. - Kết quả dương tính không phân biệt được do đáp ứng miễn dịch sau tiêm chủng hay nhiễm tự nhiên.	- Soát xét kết quả cần cẩn thận và chính xác. Kết nối hai chiều thông tin để tránh nhập kết quả thủ công gây nhầm lẫn. - Thông báo tới Bác sỹ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp. - Cần phân tích kết quả kết hợp triệu chứng lâm sàng và các xét nghiệm khác.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng sinh phẩm hóa chất mới đưa vào sử dụng (xác nhận/thẩm định phương pháp) theo mục 8.16 của quyết định 2429/QĐ-BYT năm 2016.
- Thực hiện nội kiểm định kỳ trên mẫu nội kiểm theo quy định tại mục 8.10 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Thực hiện ngoại kiểm theo mục 8.15 của quyết định 2429/QĐ-BYT.
- Để khẳng định kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tương đương hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

394. Hồng cầu trong phân test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện hồng cầu trong phân bằng kỹ thuật test nhanh .

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện hemoglobin trong phân dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Bộ sinh phẩm test nhanh hồng cầu trong phân
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Que lấy bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Đồng hồ bấm giờ
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Lấy hóa chất, thanh thử ra khỏi bao, để ở nhiệt độ phòng.
2	Dùng que hoặc pipet lấy bệnh phẩm (lượng theo hướng dẫn sử dụng của sinh phẩm), nhúng que vào lọ dung dịch trong test thử, lắc đều.
3	Nhỏ dung dịch trên vào thanh thử (lượng theo hướng dẫn sử dụng của sinh phẩm)
4	Đọc kết quả trong khoảng thời gian theo hướng dẫn sử dụng của sinh phẩm.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Xuất hiện 2 vạch trên thanh thử ở vị trí C và T.
- Âm tính: Chỉ xuất hiện 1 vạch trên thanh thử ở vị trí C.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Đọc kết quả sau quá 10 phút dễ gây phản ứng dương tính giả. Nên có đồng hồ đặt giờ để đọc kết quả đúng giờ qui định.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

395. *Angiostrogylus cantonensis* (Giun tròn chuột) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Angiostrogylus cantonensis* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Angiostrogylus cantonensis* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đong chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Angiostrogylus cantonensis* hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm *Angiostrogylus cantonensis*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition

396. *Clonorchis/Opisthorchis* (Sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Clonorchis/Opisthorchis* (Sán lá gan nhỏ) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Clonorchis/Opisthorchis* (Sán lá gan nhỏ) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đong chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm Clonorchis/Opisthorchis (Sán lá gan nhỏ) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm Clonorchis/Opisthorchis (Sán lá gan nhỏ).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

397. *Cysticercus cellulosae* (Sán lợn) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Cysticercus cellulosae* (Sán lợn) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Cysticercus cellulosae* (Sán lợn) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đông chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Cysticercus cellulosae* (Sán lợn) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm *Cysticercus cellulosae* (Sán lợn).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
2. Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
3. Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

398. *Echinococcus granulosus* (Sán dây chó) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Echinococcus granulosus* (Sán dây chó) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Echinococcus granulosus* (Sán dây chó) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đong chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm Echinococcus granulosus (Sán dây chó) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm Echinococcus granulosus (Sán dây chó).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
2. Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
3. Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

399. *Entamoeba histolytica* (Amip) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Entamoeba histolytica* (Amip) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Entamoeba histolytica* (Amip) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đong chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Entamoeba histolytica* (Amip) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm *Entamoeba histolytica* (Amip).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

400. *Fasciola* (Sán lá gan lớn) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Fasciola* (Sán lá gan lớn) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Fasciola* (Sán lá gan lớn) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 μ l
- Đầu tip 200 μ l
- Đầu tip 1000 μ l
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đong chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm Fasciola (Sán lá gan lớn) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm Fasciola (Sán lá gan lớn).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.

- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

401. *Gnathostoma* (Giun đầu gai) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Gnathostoma* (Giun đầu gai) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Gnathostoma* (Giun đầu gai) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đông chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm Gnathostoma (Giun đầu gai) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm Gnathostoma (Giun đầu gai).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.

- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
2. Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
3. Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

402. *Paragonimus* (Sán lá phổi) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Paragonimus* (Sán lá phổi) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Paragonimus* (Sán lá phổi) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đong chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Để sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Paragonimus* (Sán lá phổi) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm *Paragonimus* (Sán lá phổi).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

403. *Schistosoma* (Sán máng) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Schistosoma* (Sán máng) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Schistosoma* (Sán máng) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đong chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm Schistosoma (Sán máng) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm Schistosoma (Sán máng).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

404. *Strongyloides stercoralis* (Giun lươn) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Strongyloides stercoralis* (Giun lươn) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Strongyloides stercoralis* (Giun lươn) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đong chia vạch
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Strongyloides stercoralis* (Giun lươn) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm *Strongyloides stercoralis* (Giun lươn).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

405. *Toxocara* (Giun đũa chó, mèo) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Toxocara* (Giun đũa chó, mèo) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Toxocara* (Giun đũa chó, mèo) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đông chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm Toxocara (Giun đũa chó, mèo) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm Toxocara (Giun đũa chó, mèo).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

406. *Trichinella spiralis* (Giun xoắn) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Trichinella spiralis* (Giun xoắn) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Trichinella spiralis* (Giun xoắn) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đong chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Trichinella spiralis* (Giun xoắn) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm *Trichinella spiralis* (Giun xoắn).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

407. Ký sinh trùng Ag miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên ký sinh trùng có trong mẫu huyết thanh, huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KN hoặc KT hoặc KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm ký sinh trùng Ag ELISA Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán ký sinh trùng Ag
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 200 μ L tiết trùng
- Đầu côn 10 μ L tiết trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bowkim tiêm vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml, 1000 ml

- Kính lọc mật độ quang cho máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy rửa ELISA
- Máy đọc ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Máy ủ lắc
- Tủ ẩm
- Máy siêu ly tâm 12000g
- Máy vortex
- Hộp kín chắn sáng
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Ký sinh trùng Ag ELISA Kit (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Để số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: Xử lý chứng cùng lúc với mẫu bệnh phẩm.
5	Hút 150 μ L mẫu hoặc chứng vào từng ống polypropylene 1,5 mL
6	Thêm 150 μ L dung dịch TCA vào mỗi ống, lắc trộn kỹ.
7	Ủ 5 – 20 phút tại nhiệt độ phòng. Lắc trộn lại.
8	Ly tâm 12.000 x g trong 5 - 9 phút.
9	Chuẩn bị các ống chứa 150 μ L Neutralisation Buffer tương ứng.
10	Chuyển 150 μ L dung dịch nổi của mẫu sau ly tâm sang từng ống Neutralisation Buffer đã chuẩn bị ở trên, lắc trộn đều mẫu.
11	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
12	Nhỏ 100 μ L mẫu hoặc chứng đã xử lý vào mỗi giếng.
13	Che kín tấm đã nhỏ, ủ lắc 700-800 rpm trong 15 phút ở 37°C.
14	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
15	Thêm 100 μ L dung dịch Conjugate vào mỗi giếng.
16	Che kín tấm đã nhỏ, ủ lắc 700-800 rpm trong 15 phút ở 37°C.

Các bước	Nội dung
17	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
18	Thêm 100 μ l dung dịch dung dịch Chromogen vào mỗi giếng.
19	Che kín tấm đã nhỏ, ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng mạnh.
20	Nhỏ 50 μ l Stop Solution.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Qui trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Không phát hiện kháng nguyên ký sinh trùng trong mẫu bệnh phẩm.
- Kết quả dương tính: Phát hiện kháng nguyên ký sinh trùng trong mẫu bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chủng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bản.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (kiểm tra chất lượng, IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

408. *Taenia solium* (Sán dây lợn) Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Taenia solium* (Sán dây lợn) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG (hoặc IgM) kháng với *Taenia solium* (Sán dây lợn) có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất
- Ống máu tách huyết thanh
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu tip 10 µl
- Đầu tip 200 µl
- Đầu tip 1000 µl
- Ống nhựa sạch
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giá đựng ống máu
- Cốc đong chia vạch
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy đọc ELISA
- Máy rửa ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ ấm
- Tủ lạnh 2-8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl
- Giá đựng ống máu
- Đồng hồ bấm giờ

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Mẫu máu được lấy vào ống đông máu. Ly tâm lấy huyết thanh.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị sơ đồ mẫu chạy
2	Đề sinh phẩm, hóa chất về nhiệt độ phòng (25°C), đảo đều hóa chất.
3	Pha dung dịch rửa với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 1/20).
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Chuẩn bị giếng phản ứng theo sơ đồ mẫu chạy
6	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
7	Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
9	Thêm 100µl Conjugate vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
11	Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng. Ủ trong khoảng thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
12	Nhỏ 100µl Stop Solution.
13	Cài đặt bước sóng máy đọc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (thường là 450nm/620nm-650nm). Đọc kết quả

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Taenia solium* (Sán dây lợn) hoặc hiệu giá kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân đã từng bị nhiễm *Taenia solium* (Sán dây lợn).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Hóa chất bị hư hỏng.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo do thao tác kỹ thuật.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Kết quả không đạt nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm ra khỏi ngưỡng quy định. Giá trị ngưỡng chấp nhận cho chứng theo hướng dẫn nhà sản xuất
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

409. Ký sinh trùng Ab miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể kháng với ký sinh trùng có trong mẫu huyết thanh, huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KN hoặc KT hoặc KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Ký sinh trùng IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán Ký sinh trùng Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu 1000 μ L tiết trùng
- Đầu 200 μ L tiết trùng
- Đầu 10 μ L tiết trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml

- Kính lọc mật độ quang cho máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy rửa ELISA
- Máy đọc ELISA.
- Máy ly tâm thường
- Tủ ấm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Ký sinh trùng IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Pha loãng huyết thanh với dung dịch pha loãng theo nồng độ hướng dẫn.
5	Nhỏ 100 µl chứng dương, chứng âm (có sẵn trong bộ kit không pha loãng) và mẫu huyết thanh đã pha loãng vào mỗi giếng.
6	Ủ ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 10 phút.
7	Rửa tay hoặc rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Trong mỗi lần rửa ủ 1 phút. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
8	Thêm 100 µl Conjugate vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
9	Lặp lại bước rửa trên.
10	Nhỏ 100 µl TMB vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
11	Nhỏ 100 µl Stop Solution.
12	Đưa khay ELISA vào máy đọc. Đọc kết quả ở bước sóng 450 nm (bộ lọc tham chiếu 620/650 nm)

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Qui trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tải lặp...

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng. Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm ký sinh trùng hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm ký sinh trùng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Hóa chất bị hư hỏng.
- Nồng độ pha loãng không chính xác.
- Thời gian ủ không chính xác.
- Hóa chất chưa được đưa về nhiệt độ phòng, chưa đảo đều.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

410. *Angiostrongylus cantonensis* (giun tròn chuột) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể kháng *Angiostrongylus cantonensis* có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Angiostrongylus cantonensis* ELISA Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bạc sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Angiostrongylus cantonensis* ELISA Kit (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Angiostrongylus cantonensis</i> trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Angiostrongylus cantonensis</i> bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch:

Các bước	Nội dung
	Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1, B1 là mẫu chứng âm, C1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắt ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy ELISA tự động.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Angiostrongylus cantonensis* hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm *Angiostrongylus cantonensis*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)

- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

411. *Clonorchis/opisthorchis* (sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM hoặc IgG kháng với *Clonorchis/Opisthorchis* có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Clonorchis* IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Clonorchis/Opisthorchis*
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Clonorchis* IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Clonorchis</i> trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Clonorchis</i> bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch:

Các bước	Nội dung
	Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1, B1 là mẫu chứng âm, C1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tấm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy ELISA tự động

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm Clonorchis/Opisthorchis hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm Clonorchis/Opisthorchis.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.

- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

412. *Cysticercus cellulosae* (sán lợn) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Cysticercus cellulosae* có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Cysticercosis IgG (Taenia Solium) ELISA Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Cysticercus cellulosae* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Còn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng

- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Cysticercosis IgG (Taenia Solium) ELISA Kit (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Cysticercosis IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Cysticercosis IgG bằng cách chọn bệnh

	nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1 là mẫu chứng âm, B1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl giọt cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy ELISA tự động

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Cysticercus cellulosae* hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm *Cysticercus cellulosae*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)

- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

413. *Echinococcus granulosus* (sán dây chó) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Echinococcus granulosus* có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Echinococcus* IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Echinococcus granulosus* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Echinococcus* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương) chạy trên hệ thống ELISA tự động

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, dầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Echinococcus</i> IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Echinococcus</i> IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm.

	Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1 là mẫu chứng âm, B1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl giọt cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy ELISA tự động

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kì hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Echinococcus granulosus* hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm *Echinococcus granulosus*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

414. *Entamoeba histolytica* (amip) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Entamoeba histolytica* có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Entamoeba histolytica* (Amebiasis) (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Entamoeba histolytica* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Entamoeba histolytica* IgG (Amebiasis) (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Entamoeba histolytica</i> IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Entamoeba histolytica</i> IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm.

Các bước	Nội dung
	Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1 là mẫu chứng âm, B1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl giọt cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy ELISA tự động

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Entamoeba histolytica* hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm *Entamoeba histolytica*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.

- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

415. *Fasciola* (sán lá gan lớn) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Fasciola* có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Fasciola* IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Fasciola* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μL tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μL tiết trùng
- Đầu côn 1000 μL tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μL tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Fasciola* IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Fasciola</i> IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Fasciola</i> IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm.

Các bước	Nội dung
	Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1 là mẫu chứng âm, B1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl giọt cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy ELISA tự động

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm Fasciola hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm Fasciola .

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.

- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

416. *Gnathostoma* (giun đầu gai) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Gnathostoma* có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Gnathostoma* IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Gnathostoma* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng

- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Gnathostoma* IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Gnathostoma</i> IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Gnathostoma</i> IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm.

Các bước	Nội dung
	Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1 là mẫu chứng âm, B1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl giọt cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy ELISA tự động

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Gnathostoma* hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm *Gnathostoma*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.

- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

417. *Paragonimus* (sán lá phổi) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Paragonimus* có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Paragonimus* IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Paragonimus* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μL tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μL tiết trùng
- Đầu côn 1000 μL tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μL tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Paragonimus* IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu vào mỗi giếng đã định.
7	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
8	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
9	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
10	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Paragonimus</i> IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp.

Các bước	Nội dung
	Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Paragonimus</i> IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
11	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình.
12	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
13	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
14	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
15	Tắt máy tính.
16	Tắt máy ELISA tự động

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Xem xét kết quả QC:

Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
- Qui trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Paragonimus* hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm *Paragonimus*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cẩn cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

418. *Schistosoma* (sán máng) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Schistosoma* có trong mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Schistosoma* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Schistosoma* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất)

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Schistosoma* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương) chạy trên hệ thống ELISA tự động.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Schistosoma</i> IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Schistosoma</i> IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch:

Các bước	Nội dung
	Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1 là mẫu chứng âm, B1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl giọt cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Schistosoma* hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm *Schistosoma* .

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

419. *Strongyloides stercoralis* (giun lươn) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Strongyloides stercoralis* có trong mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Strongyloides stercoralis* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Strongyloides stercoralis* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng

- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Strongyloides stercoralis* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương) chạy trên hệ thống ELISA tự động.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Strongyloides stercoralis</i> IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Strongyloides stercoralis</i> IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm.

Các bước	Nội dung
	Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1 là mẫu chứng âm, B1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl giọt cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Strongyloides stercoralis* hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm *Strongyloides stercoralis* .

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

420. *Toxocara* (giun đũa chó, mèo) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Toxocara* có trong mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Toxocara* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Toxocara* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Toxocara* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương) chạy trên hệ thống ELISA tự động.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Toxocara</i> IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Toxocara</i> IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó

Các bước	Nội dung
	chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1 là mẫu chứng âm, B1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl giọt cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tầm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm Toxocara hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm Toxocara .

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

421. *Trichinella spiralis* (giun xoắn) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Trichinella spiralis* có trong mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh, bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Trichinella spiralis* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Trichinella spiralis* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Trichinella spiralis* IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương) chạy trên hệ thống ELISA tự động.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Trichinella spiralis</i> IgG Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Trichinella spiralis</i> IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm.

Các bước	Nội dung
	Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1 là mẫu chứng âm, B1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl giọt cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Trichinella spiralis* hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm *Trichinella spiralis*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.

- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

422. Ký sinh trùng Ag miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên ký sinh trùng có trong mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm ký sinh trùng Ag ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán ký sinh trùng Ag
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh

- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Máy ủ lắc
- Tủ ẩm
- Máy siêu ly tâm 12000g
- Máy vortex
- Hộp kín chắn sáng
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm ký sinh trùng Ag ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương) chạy trên hệ thống ELISA tự động.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: Xử lý chứng cùng lúc với mẫu bệnh phẩm.
5	Hút 150 μ L mẫu hoặc chứng vào từng ống polypropylene 1,5 mL
6	Thêm 150 μ L dung dịch TCA vào mỗi ống, lắc trộn kỹ.
7	Ủ 5 – 20 phút tại nhiệt độ phòng. Lắc trộn lại.
8	Ly tâm 12.000 x g trong 5 - 9 phút.
9	Chuẩn bị các ống chứa 150 μ L Neutralisation Buffer tương ứng.
10	Chuyển 150 μ L dung dịch nổi của mẫu sau ly tâm sang từng ống Neutralisation Buffer đã chuẩn bị ở trên, lắc trộn đều mẫu.
11	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
12	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Cho 100 μ L chất chứng và 100 μ L mẫu vào mỗi giếng đã định.
13	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
14	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...

Các bước	Nội dung
15	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
16	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Ag trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Ag bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
17	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình.
18	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
19	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tẩm ra sau khi chạy máy xong.
20	Vệ sinh máy:

Các bước	Nội dung
	Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
21	Tắt máy tính.
22	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Không phát hiện kháng nguyên ký sinh trùng trong mẫu bệnh phẩm.
- Kết quả dương tính: Phát hiện kháng nguyên ký sinh trùng trong mẫu bệnh phẩm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)

- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

423. *Taenia solium* (sán lợn) Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Taenia solium* có trong mẫu huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa:

- ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): Thử nghiệm miễn dịch hấp phụ gắn enzym.
- OD (Optical density): Mật độ quang

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Taenia solium* IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán *Taenia solium* Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khẩn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh người.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Taenia solium* IgG ELISA Kit (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân:

Các bước	Nội dung
	Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm <i>Taenia solium</i> IgG trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm <i>Taenia solium</i> IgG bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1 là mẫu chứng âm, B1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl giọt cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.

Các bước	Nội dung
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy ELISA tự động

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

- Xem xét kết quả QC:

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*

Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

+ *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*

NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC

Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả:

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm *Taenia solium* hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm *Taenia solium*.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

424. Ký sinh trùng Ab miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể kháng với ký sinh trùng có trong mẫu huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh, bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm ký sinh trùng IgG ELISA Kit (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán ký sinh trùng Ab
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn dẫn điện 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn dẫn điện 300 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiết trùng
- Khay vi giếng Microplate
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiem
- Bơm tiem vô trùng

- Panh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Kính lọc mật độ quang cho máy ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Hệ thống máy ELISA tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống máy tiền phân tích
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Filariasis IgM ELISA kit (Ví dụ hoặc tương đương) chạy trên hệ thống ELISA tự động.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Filariasis IgM trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Filariasis IgM bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm.

Các bước	Nội dung
	Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip. Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Chuẩn bị mẫu: Các mẫu phải được pha loãng 1/100 với dung dịch đệm mẫu và trộn kỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất - Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Giếng A1, B1 là mẫu chứng âm, C1 là mẫu chứng dương. - Cho 100 µl chất chứng và 100 µl mẫu bệnh phẩm vào mỗi giếng đã định. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó rửa sạch. - Cho 100 µl cộng hợp enzyme vào tất cả các giếng. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Rửa phiên nhựa. - Cho 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng. - Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng, sau đó lắc kỹ tám trong 15 giây. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tám ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy.

4.2. Nhận định kết quả

Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình. Có thể in ra một phần hoặc toàn bộ kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả

Kết quả được đánh giá bằng tín hiệu đo quang học (OD). Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kết quả âm tính: Bệnh nhân không bị nhiễm ký sinh trùng hoặc nồng độ kháng thể ở dưới mức phát hiện được.
- Kết quả dương tính: Bệnh nhân bị nhiễm ký sinh trùng .

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.

- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

425. *Plasmodium* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện vật liệu di truyền đặc trưng của các loại ký sinh trùng sốt rét sau: *Plasmodium vivax* (PV), *Plasmodium ovale* (PO), *Plasmodium falciparum* (PF), *Plasmodium malariae* (PM), *Plasmodium knowlesi* (PK) trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Malaria Assay (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chân đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm

- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu toàn phần có chất chống đông EDTA.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

l pư	N pư	Thành phần
5 µL	N * 5	Malaria MOM
5 µL	N * 5	SEMX1
5 µL	N * 5	RNase-free water
15 µL	N * 15	Tổng thể tích Mastermix

- Đảo trộn ống nhẹ nhàng khoảng 5 lần hoặc vortex sau đó ly tâm spindown.

- Hút 15 µl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu..

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 5 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 5 µl chứng dương CA và 5 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 20 µl.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu huỳnh quang: FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 và Quasar 705.

- Đọc tín hiệu huỳnh quang ở bước 3 & 4 (đọc ở 60°C và 72°C)
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 705 dương tính & đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu Quasar 670 âm tính.
- Chứng âm phải âm tính.

4.2.2 Đọc và phân tích kết quả

Phân tích kết quả trong phần mềm phân tích theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

426. *Trichomonas vaginalis* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện RNA từ *Trichomonas vaginalis* (TV) trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm STI AMP (VD hoặc tương đương)
- Ethanol
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Tăm bông vô trùng
- Panh

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy PCR tự động và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch âm đạo, dịch niệu đạo, dịch cổ tử cung, bệnh phẩm phụ khoa được thu thập trong dung dịch bảo quản, nước tiểu.

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Điều kiện bảo quản:

Loại mẫu	Nhiệt độ bảo quản	Thời gian ổn định
Tăm bông dịch cổ tử cung, dịch âm đạo, nước tiểu trong môi trường vận chuyển	2 – 30°C	14 ngày
	-20°C ± 5°C	60 ngày*
Bệnh phẩm phụ khoa trong môi trường PreservCyt Specimens	2 – 30°C	14 ngày
	-20°C ± 5°C	60 ngày*
* Rã đông không quá 4 lần		

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Vận hành máy xét nghiệm thực hiện theo hướng dẫn nhà sản xuất

Thực hiện bảo trì máy:

- Kiểm tra trạng thái bảo trì ở mục “Overview > Procedures >
- Thực hiện bảo trì nếu đến hạn

Bắt đầu mở chạy:

- Từ màn hình Create Order (Tạo lệnh), chọn xét nghiệm cần chạy (STI).

Bảo dưỡng cuối ngày:

- Hoàn tất công việc vệ sinh máy.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

* Phát hiện ức chế và/hoặc sự thiếu hụt tế bào

Số chu kỳ (CN) của mẫu chứng nội bộ IC của tất cả các mẫu phải nằm trong khoảng giá trị hợp lệ. Một lượng IC (mẫu chứng nội bộ) đã xác định, nhất quán có trong từng phản ứng PCR và được đo trên Hệ thống máy xét nghiệm nhằm xác nhận rằng không có ức chế PCR nào có trong mẫu. Xét nghiệm STI cũng phát hiện được một DNA người nội sinh (CC: Mẫu chứng tế bào) để đánh giá sự hợp lệ của thể tích mẫu, hiệu quả chiết tách mẫu, và hiệu quả khuếch đại.

- Đối với các mẫu dương tính: Nếu IC CN hoặc CC CN nằm ngoài khoảng, nhưng (các) đích xét nghiệm trong mẫu đó lại Dương tính (Positive), thì mẫu sẽ có kết quả Dương tính. Cờ IC hoặc CC sẽ hiển thị kế bên kết quả dương tính.
- Đối với các mẫu âm tính: Nếu IC CN hoặc CC CN nằm ngoài khoảng và (các) đích xét nghiệm trong mẫu đó lại không Dương tính (not Positive), thì không có kết quả nào được báo cáo cho đích đó và sẽ có mã thông báo.

*Mẫu chứng

Khuyến cáo xét nghiệm một mẫu chứng âm tính STI Negative CTRL và một mẫu chứng dương tính STI Positive CTRL, định kỳ tối thiểu 48 giờ một lần để theo dõi hiệu năng của xét nghiệm và Hệ thống máy xét nghiệm. Phải có được các kết quả hợp lệ cho tất cả các mức mẫu chứng trước khi báo cáo kết quả mẫu xét nghiệm.

Cờ báo lỗi mẫu hoặc Mã thông báo sẽ hiển thị khi một kết quả mẫu chứng không hợp lệ.

- Chứng dương: Phải dương tính với các tác nhân đích. Nếu mẫu chứng cho một đích xét nghiệm (CT, NG, TV, hoặc MG) không hợp lệ, phải xét nghiệm lại tất cả mẫu của mẻ chạy.
- Chứng âm: CT, NG, TV, hoặc MG không được có mặt trong mẫu chứng âm tính.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Tính toán

- Xét nghiệm STI là một xét nghiệm định tính. Đối với mỗi tín hiệu đích (CT, NG, TV, hoặc MG), số chu kỳ (CN) khuếch đại được xác định khi hệ thống máy xét nghiệm phát hiện tín hiệu huỳnh quang. Mỗi tín hiệu sẽ được xác định hoặc là “Positive” (Dương tính) nếu CN nhỏ hơn hoặc bằng chu kỳ ngưỡng xét nghiệm cố định hoặc “Negative” (Âm tính) nếu không có CN hoặc CN lớn hơn chu kỳ ngưỡng xét nghiệm. Hệ thống máy xét nghiệm tự động báo cáo kết quả trên màn hình làm việc.

Diễn giải kết quả

Xét nghiệm	Kết quả	Diễn giải	Cờ
CT	Dương tính CT	Phát hiện đích CT	
CT	Âm tính CT	Không phát hiện đích CT	
NG	Dương tính NG	Phát hiện đích NG	
NG	Âm tính NG	Không phát hiện đích NG	
TV	Dương tính TV	Phát hiện đích TV	
TV	Âm tính TV	Không phát hiện đích TV	
MG	Dương tính MG	Phát hiện đích MG	
MG	Âm tính MG	Không phát hiện đích MG	

Các kết quả hiển thị trên màn hình sẽ chỉ chứa những kết quả được yêu cầu trong lệnh xét nghiệm.

Nếu một mẫu bệnh phẩm nhận được cờ cảnh báo và mã thông báo cho bất cứ xét nghiệm riêng nào, thì mẫu bệnh phẩm phải được xét nghiệm lại bằng cách tạo lệnh xét nghiệm cho những xét nghiệm không cho ra kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

- ⇒ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
- ⇒ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
- ⇒ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
- ⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình .
- Chứng dương bị hỏng ⇒ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Quyết định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

427. Ký sinh trùng Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện vật liệu di truyền đặc trưng của ký sinh trùng trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm xét nghiệm phát hiện ký sinh trùng “X” (VD hoặc tương đương)
- Hóa chất, vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiết trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm có thể khác nhau tùy loại ký sinh trùng gây bệnh. Bệnh phẩm được đựng trong ống vô khuẩn.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Trước khi tách chiết cho chứng nội (IC) vào từng giếng nhỏ bệnh phẩm.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chuẩn bị ống Master Mix với tỷ lệ các thành phần như hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Đảo trộn ống nhẹ nhàng khoảng 5 lần hoặc vortex sau đó ly tâm spindown.
- Chia Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* Real-time PCR: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương CA và chứng âm.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.

- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, chọn màu huỳnh quang phù hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc thì phân tích kết quả.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu. Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 37$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

⇒ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

⇒ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình .
- Chứng dương bị hỏng ⇒ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

428. *Toxoplasma gondii* Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của *Toxoplasma gondii* trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Toxoplasma gondii* Real - TM (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8tuýp/1thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm

- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khảm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần, máu cuống rốn, tế bào bạch cầu, mô sinh thiết, dịch ối được đựng trong lọ vô trùng không chứa môi trường vận chuyển.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- *Máu toàn phần/máu cuống rốn*: được thu nhận trong ống có chất chống đông EDTA.
- *Tế bào bạch cầu (WBCs)*: Lấy 2,5-10 ml mẫu máu vào ống chứa chất chống đông EDTA. Ly tâm mẫu ở ~ 1500-2000 X g trong 10-15 phút. Sau ly tâm sẽ tách máu thành một lớp huyết tương trên, một lớp tế bào hồng cầu (RBCs) bên dưới, và một lớp phân cách mỏng chứa các bạch cầu (còn gọi là buffy coat). Dùng pipet để loại bỏ huyết tương, cẩn thận để không làm xáo trộn các bạch cầu. Các mẫu có số lượng bạch cầu đặc biệt cao sẽ có lớp buffy coat dày hơn. Sử dụng pipet chuyên để hút cẩn thận lớp buffy coat với thể tích khoảng 0,5 ml hoặc nhỏ hơn. Hút từ từ, sử dụng chuyển động tròn, để kéo tất cả vật liệu có lớp màng đệm có thể nhìn thấy vào pipet chuyên. Có thể sẽ có một số WBCs bị lẫn với các RBCs bên dưới.
- *Mô sinh thiết và khám nghiệm tử thi*: được lấy từ vị trí dự kiến của mầm bệnh, từ mô bị tổn thương hoặc từ khu vực tiếp giáp với mô bị tổn thương. Thu mẫu vào ống 2 ml có 0,3 ml môi trường vận chuyển. Chuyển mẫu vào cối sứ; thêm một thể tích muối hoặc PBS bằng nhau. Đồng nhất thật kỹ mẫu vật bằng chày sứ. Lấy một lượng 100 µl và chuyển vào một ống vô trùng để tách chiết DNA.
- *Dịch ối*: Nước ối phải được lấy trong quá trình chọc dò ối theo quy trình chuẩn và được thu vào ống Eppendorf vô trùng. Trộn lại kỹ lưỡng mẫu thu được và chuyển 1 ml mẫu này vào một ống vô trùng mới. Ly tâm ống ở 8.000-9.000 g trong 10 phút. Loại bỏ phần nổi phía trên, để lại 200 µl phía trên dịch cặn. Trộn đều dịch cặn sử dụng cho tách chiết DNA.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho 10 µl chứng nội IC (Internal Control) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

** Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR*

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Các thành phần của Master mix được thực hiện như bảng sau:

Thành phần	Thể tích (µl)
PCR-mix-1	10 x N
PCR-mix-2- FRT	5 x N
TaqF DNA Polymerase	0.5 x N

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Vortex và ly tâm hỗn hợp Master mix trong vài giây. Chia 15 µl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

** Real-time PCR:* Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 10 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 µl chứng dương và 10 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 25 µl.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:
- Màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện chứng nội, JOE/HEX/Cy3 cho phát hiện *Toxoplasma gondii*.
- Chu kỳ nhiệt: Cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó..

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

- Mẫu được xem là dương tính với *Toxoplasma gondii* nếu giá trị Ct trên kênh JOE(Yellow)/HEX/Cy3 ≤ 38 , Ct trên kênh FAM nằm trong giới hạn.
- Mẫu âm tính khi giá trị Ct trên kênh FAM (Green) nằm trong giới hạn và không xuất hiện tín hiệu huỳnh quang trên kênh JOE (Yellow)/HEX/Cy3.
- Kết quả không hợp lệ nếu giá trị Ct của mẫu trên kênh JOE(Yellow)/HEX/Cy3 không xuất hiện trong khi giá trị Ct trên kênh FAM (Green) hoặc không có hoặc cao hơn giá trị giới hạn ($Ct > 35$). Cần lặp lại xét nghiệm với mẫu như vậy.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
 - Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 - $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR ⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình .
- Chứng dương bị hỏng ⇒ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn ⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

429. *Toxoplasma* IgM miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng *Toxoplasma gondii* trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA. Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: *Toxoplasma* IgM: Kháng thể IgM kháng *Toxoplasma*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Toxoplasma gondii* IgM ELISA
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ âm sâu (- 20°C hoặc - 70°C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10µl đến 1000µl.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Toxoplasma gondii* IgM ELISA

Các bước	Nội dung
1.	Chuẩn bị đủ số giếng cần sử dụng.
2.	- Pha dung dịch rửa: Pha loãng chất rửa đậm cô đặc (V1) 01:30 với nước cất cho ra dung tích cuối cùng của V2.
3.	RF- absorbent được thực hiện bằng cách ủ mẫu của bệnh nhân trong chất đậm Rf pha loãng trong 15 phút ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4 °C : 200 µl Rf-absorbent +800 µl dung dịch đậm pha loãng.
4.	- Pha loãng mẫu với 10µl bệnh phẩm+1000µl Rf- đậm pha loãng
5.	- Cho 100 µl mẫu chứng và mẫu pha loãng vào các giếng theo thứ tự: A1: Giếng trống B1: Chứng âm C1: Huyết thanh chuẩn D1: Huyết thanh chuẩn Từ E1: Bệnh phẩm đã pha loãng
6.	- Ủ ở 37 ° C (+ / - 1 ° C) trong 60 phút (+ / - 5 phút)
7.	Rửa 4 lần bằng dung dịch rửa. Thấm khô
8.	- Cho 100 µl dung dịch cộng hợp vào các giếng thích hợp (trừ giếng trống)
9.	Ủ ở 37°C (+/- 1°C) trong máy ủ hơi trong 30 phút (+/- 1 phút)
10.	Rửa 4 lần bằng dung dịch rửa. Thấm khô.
11.	- Thêm 100µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng (bao gồm giếng trống)
12.	- Ủ ở 37°C (+/- 1°C) trong máy ủ hơi trong 30 phút (+/- 1 phút)
13.	Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, lắc các giếng một cách nhẹ nhàng để trộn đều dung dịch
14.	Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 405/620 nm. Đọc kết quả OD trong 60 phút

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

- Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tính giá trị ngưỡng (CO)

- Kết quả được đọc trên máy đọc ELISA và đối với việc đánh giá tự động của tín hiệu đo lường quang học, các phần mềm SERION easyANALYZE, các phần mềm SERION đánh giá cũng như phần mềm Microsoft® Excel® -dựa trên công cụ phần mềm SERION activity có sẵn theo yêu cầu.

b. Điều kiện của phản ứng

Thử nghiệm có giá trị khi thỏa mãn điều kiện:

- Giếng trống không chất nền phải là $<0,25$ OD
- Chứng âm: phải âm tính.
- Bằng cách sử dụng các xét nghiệm định lượng SERION ELISA classic kiểm tra giá trị OD trung bình (sau khi trừ giếng trống cơ chất) của huyết thanh chuẩn phải nằm trong phạm vi hiệu chuẩn, được đưa ra trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng theo lô cụ thể.
- Bằng cách sử dụng các xét nghiệm định lượng SERION ELISA classic kiểm tra giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình tại ngưỡng huyết thanh phải nằm trong phạm vi hiệu chuẩn, được đưa ra trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng lô cụ thể (sau khi trừ giếng trống cơ chất).
- Biến thiên các giá trị OD của huyết thanh chuẩn hoặc huyết thanh tại ngưỡng không thể cao hơn 20%.

Nếu các tiêu chí này không được đáp ứng, xét nghiệm không có giá trị và phải được lặp lại.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Các khoảng ranh giới của xét nghiệm SERION ELISA *classic* Toxoplasma gondii IgM được quy định trong giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng và cho biết ranh giới của kết quả xét nghiệm:

- + Các giá trị dưới khoảng này: Âm tính.
- + Các giá trị trên phạm vi này: Dương tính.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Tuân thủ đúng qui trình xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

430. *Toxoplasma* IgG miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng *Toxoplasma gondii* trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ELISA.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA. Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KKT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

Định nghĩa: *Toxoplasma* IgG: Kháng thể IgG kháng *Toxoplasma*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm *Toxoplasma gondii* IgG ELISA
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (- 20°C hoặc - 70°C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10µl đến 1000µl.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.5. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm *Toxoplasma gondii* IgG ELISA

Các bước	Nội dung
1.	Chuẩn bị đủ số giếng cần sử dụng.
2.	- Pha dung dịch rửa: Pha loãng chất rửa đậm cô đặc (V1) 01:30 với nước cất cho ra dung tích cuối cùng của V2.
3.	Pha loãng mẫu với 10 μ l bệnh phẩm+1000 μ l dung dịch pha loãng
4.	- Cho 100 μ l mẫu chứng và mẫu pha loãng vào các giếng theo thứ tự: A1: Giếng trống B1: Chứng âm C1: Huyết thanh chuẩn D1: Huyết thanh chuẩn Từ E1: Bệnh phẩm đã pha loãng
5.	- Ủ ở 37 ° C (+ / - 1 ° C) trong 60 phút (+ / - 5 phút)
6.	Rửa 4 lần bằng dung dịch rửa. Thấm khô
7.	- Cho 100 μ l dung dịch cộng hợp vào các giếng thích hợp (trừ giếng trống)
8.	Ủ ở 37°C (+/- 1°C) trong máy ủ hơi trong 30 phút (+/- 1 phút)
9.	Rửa 4 lần bằng dung dịch rửa. Thấm khô.
10.	- Thêm 100 μ l dung dịch cơ chất cho vào mỗi giếng (bao gồm giếng trống)
11.	- Ủ ở 37°C (+/- 1°C) trong máy ủ hơi trong 30 phút (+/- 1 phút)
12.	Thêm 100 μ l dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, lắc các giếng một cách nhẹ nhàng để trộn đều dung dịch
13.	Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 405/620 nm. Đọc kết quả OD trong 60 phút

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Xem xét kết quả QC: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương, chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất

a. Tính giá trị ngưỡng (CO)

- Kết quả được đọc trên máy đọc ELISA và đối với việc đánh giá tự động của tín hiệu đo lường quang học, các phần mềm SERION easyANALYZE, các phần mềm

SERION đánh giá cũng như phần mềm Microsoft® Excel® -dựa trên công cụ phần mềm SERION activity có sẵn theo yêu cầu.

b. Điều kiện của phản ứng

Thử nghiệm có giá trị khi thỏa mãn điều kiện:

- Giếng trống không chất nền phải là $<0,25$ OD
- Chứng âm: phải âm tính.
- Bảng cách sử dụng các xét nghiệm định lượng SERION ELISA classic kiểm tra giá trị OD trung bình (sau khi trừ giếng trống cơ chất) của huyết thanh chuẩn phải nằm trong phạm vi hiệu chuẩn, được đưa ra trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng theo lô cụ thể.
- Bảng cách sử dụng các xét nghiệm định lượng SERION ELISA classic kiểm tra giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình tại ngưỡng huyết thanh phải nằm trong phạm vi hiệu chuẩn, được đưa ra trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng lô cụ thể (sau khi trừ giếng trống cơ chất).
- Biến thiên các giá trị OD của huyết thanh chuẩn hoặc huyết thanh tại ngưỡng không thể cao hơn 20%.

Nếu các tiêu chí này không được đáp ứng, xét nghiệm không có giá trị và phải được lặp lại.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

- Các khoảng ranh giới của xét nghiệm SERION ELISA *classic* Toxoplasma gondii IgG được quy định trong giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng và cho biết ranh giới của kết quả xét nghiệm.
 - + Các giá trị dưới khoảng này: kết quả xét nghiệm âm tính.
 - + Các giá trị trên khoảng này: kết quả xét nghiệm dương tính.
- SERION ELISA Toxoplasma IgG có thể được sử dụng như là một xét nghiệm sàng lọc. Kết quả âm tính với SERION ELISA Toxoplasma IgG (<10 LU / ml)

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn

Xử trí:

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Tuân thủ đúng qui trình xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

431. *Toxoplasma* IgM miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgM kháng *Toxoplasma gondii* trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật miễn dịch tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang “ECLIA”. Dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KKT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

Định nghĩa: *Toxoplasma gondii*: là ký sinh trùng đơn bào. Toxoplasmosis là một bệnh nhiễm ký sinh trùng thông thường do *Toxoplasma gondii*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ Vi Sinh /Bác sĩ Xét nghiệm /Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Toxo IgM
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm

- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (- 20°C) hoặc (- 70°C) (nếu có)
- Micropipette thể tích từ 50 µl đến 200 µl..

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút (1 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bộ sinh phẩm Toxo IgM

Các bước	Nội dung
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa.
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên (nếu thấy cần thiết) thì tiến hành chạy chứng (Tham khảo qui trình chạy chứng...)
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng.
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm
4	Chọn tên test là Toxo IgM
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

a. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất:

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

b. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

4.2.2. Đọc kết quả

- Nếu $COI < 0.80$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với Toxo IgM.
- Nếu $0.8 \leq COI < 1.0$: mẫu bệnh phẩm này nằm ở giới hạn ngưỡng và cần phải kiểm tra lại.
- Nếu $COI \geq 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với thử nghiệm Toxo IgM.

Những mẫu không xác định cần kiểm tra lại lần 2. Nếu vẫn lặp lại kết quả lần đầu thì nên xét nghiệm lại với mẫu bệnh phẩm thứ hai sau 2 – 3 tuần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ) → Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng)

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

432. Toxoplasma IgG miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể IgG kháng *Toxoplasma gondii* trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng kỹ thuật miễn dịch tự động.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang “ECLIA”. Dùng hoạt chất phát quang làm chất đánh dấu KKT. Dưới tác dụng của điện cực, chất đánh dấu hóa phát quang sẽ bị kích hoạt và tạo ra ánh sáng.

Định nghĩa: *Toxoplasma gondii*: là ký sinh trùng đơn bào. Toxoplasmosis là một bệnh nhiễm ký sinh trùng thông thường do *Toxoplasma gondii*.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ Vi Sinh /Bác sĩ Xét nghiệm /Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Toxo IgG
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Hóa chất cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm

- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Hệ thống máy xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C) hoặc (- 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette thể tích từ 50 µl đến 200 µl..

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút (1 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- 4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Xét nghiệm định lượng Toxo IgG
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests.
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng.
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm
4	Chọn tên test là Toxo IgG
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

4.2. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

a. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất:

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

b. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: Nếu $COI < 1 \text{ IU/ml}$
- Không xác định: Nếu $1 \leq COI < 30 \text{ IU/ml}$
- Dương tính: Nếu $COI \geq 30 \text{ IU/ml}$

Những mẫu không xác định cần kiểm tra lại lần 2. Nếu vẫn lặp lại kết quả lần đầu thì nên xét nghiệm lại với mẫu bệnh phẩm thứ hai sau 2 – 3 tuần.

* Ngưỡng phát hiện và dải định lượng:

- Ngưỡng phát hiện: 0,13 IU/ml
- Dải định lượng: 0,13 – 650 IU/ml

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ)→ Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng)

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.

- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

433. *Cryptococcus* test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định kháng nguyên *Cryptococcus sp.* trong mẫu máu hoặc dịch não tủy bệnh nhân bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch. Kháng nguyên có trong mẫu thử khi đi qua vùng cộng hợp sẽ kết hợp với kháng thể có gắn chất tạo màu. Sau đó phức hợp miễn dịch này tiếp tục di chuyển trên giấy sắc ký đến vùng phản ứng sẽ bị giữ lại tại vạch phản ứng kết hợp với kháng thể đặc hiệu, kết quả vạch phản ứng hiện màu có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

Định nghĩa:

- Vạch C : Control line
- Vạch T : Test line

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Crypto (VD hoặc tương đương)
- Hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký Crypto
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 200 µl vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2-8°C
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu máu toàn phần, huyết tương, huyết thanh hoặc dịch não tủy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 60 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Đưa thanh thử để ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- Lấy thanh thử ra khỏi bao, để trên mặt phẳng khô sạch.
- Lấy 20µl mẫu (máu toàn phần, huyết tương, huyết thanh, hoặc dịch não tủy) cho vào giếng S.
- Nhỏ 3 giọt dung dịch pha loãng vào giếng S.
- Đọc kết quả trong thời gian 15 phút.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả test nhanh khi có vạch C.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

- Âm tính: chỉ có vạch C.
- Dương tính: có cả 2 vạch C và T
- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

434. Vi sinh vật cấy kiểm tra không khí

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Đánh giá sự hiện diện của các vi sinh vật trong không khí về số lượng và chất lượng.

Phát hiện nguồn nhiễm vi sinh vật gây nhiễm trùng bệnh viện có trong không khí.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi sinh vật được đánh giá về số lượng và chất lượng bằng phương pháp nuôi cấy kính hiển vi. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Thuốc thử khả năng sinh oxydase của vi khuẩn
- Thạch máu
- Thạch Sabouraud
- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Khí cacbon dioxit (CO₂)
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Cồn 96%
- Dầu soi kính
- Axit ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Nước cất
- Nội kiểm chất lượng*
- Lam kính
- Bơm tiêm nhựa

- Ống nghiệm
- Que gồ xử lý bệnh phẩm
- Đầu tip lọc loại 10 μ L
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giá đựng ống nghiệm
- Đèn cồn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C

- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 μ l đến 1000 μ l

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Không khí phòng mổ trước mổ, phòng vô trùng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 72-120 giờ (3 - 5 ngày) có thể lâu hơn cho các loài vi nấm mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Phương pháp lắng bụi trực tiếp của Koch

4.1.1. Thời điểm lấy mẫu:

- Đối với phòng mổ mẫu không khí được lấy vào thời điểm trước khi mổ vào đầu buổi sang.
- Các mẫu không khí sẽ được lấy trong điều kiện hệ thống thông gió đang hoạt động bình thường.

4.1.2. Phương pháp lấy mẫu:

Lấy mẫu tại 5 điểm: 1 ở giữa phòng và 4 ở góc phòng. Mỗi nơi đặt 1 đĩa thạch máu và 1 đĩa Sabauround đã được kiểm tra độ vô khuẩn. Đặt cách nền nhà 1m. Mở nắp đĩa 10 phút, sau đó đậy nắp đĩa.

4.1.3. Nuôi cấy và ủ ấm:

- Thạch máu: 35-37°C, 24-48 tiếng, khí trường thông thường.
- Thạch Sabauround: 22-25°C, 7-10 ngày, khí trường thông thường

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả:

- Đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch.

- Đo đường kính của đĩa petri.
- Đếm số lượng khuẩn lạc trên mỗi đĩa thạch. Tổng số VK/1m³ không khí được tính theo công thức của Omelanski V:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100}{S \times k}$$

X: Tổng số vi khuẩn/m³ không khí

A: Số lượng vi khuẩn

S: Diện tích đĩa petri

k: Hệ số tính theo thời gian đặt hộp thạch (k = 2 nếu đặt 10 phút)

4.2.2. Phiên giải kết quả:

Hiện nay chưa có một tiêu chuẩn qui định về số lượng VSV không khí của phòng mổ, phòng bệnh, phòng pha chế, cơ sở sản xuất. Tuy nhiên có thể khẳng định được rằng về nguyên tắc các phòng mổ trước mổ hoặc các phòng đòi hỏi vô khuẩn cao nhất thiết không còn sự hiện diện của bất cứ loài vi sinh vật nào. Tham khảo tiêu chuẩn đánh giá không khí phòng mổ, phòng vô trùng của CDC:

- Đánh giá không khí sạch về số lượng:
 - + Không khí rất sạch có dưới 500 VSV/1m³ không khí.
 - + Không khí sạch có từ 500 - 1.000 VSV/1m³ không khí.
 - + Không khí tương đối sạch có từ 1.000 - 2.000 VSV/1m³ không khí.
 - + Không khí bẩn có trên 2.000 VSV/1m³ không khí.
- Đánh giá không khí sạch về chất lượng:
- Không có tụ cầu, liên cầu, nấm gây bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Mẫu không khí lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Nếu kết quả cho thấy số lượng hoặc chất lượng vi sinh vật có trong không khí vượt quá tiêu chuẩn cho phép thì cần áp dụng các biện pháp can thiệp như làm sạch và khử trùng nền, tường, trần nhà, máy móc, trang thiết bị trong phòng.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

435. Vi sinh vật cấy kiểm tra bàn tay

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Đánh giá sự hiện diện của các vi sinh vật trên bàn tay phẫu thuật viên sau khi rửa tay ngoại khoa.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi sinh vật được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Thuốc thử khả năng sinh indole của vi khuẩn
- Thuốc thử khả năng sinh oxydase của vi khuẩn
- Thạch máu
- Thạch Mac Conkey
- Canh thang BHI hiếu khí 5ml
- Canh thang BHI yếm khí 5ml
- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Khí Cacbon dioxit (CO₂)
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Cồn 96%
- Dầu soi kính
- Axit ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Nội kiểm chất lượng*

- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Ống nghiệm kích thước 18x180mm
- Lam kính
- Bơm tiêm nhựa
- Đầu tip loại 10 μ L
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giá đựng ống nghiệm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu tay phẫu thuật viên sau rửa tay ngoại khoa, trước mổ.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 72-120 giờ (3 - 5 ngày) có thể lâu hơn cho các loài vi khuẩn mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Lấy bệnh phẩm

Dùng 2 tấm bông vô khuẩn đã được làm ướt bằng nước muối sinh lý 0,9% quệt mạnh vào các vị trí đầu ngón trỏ, kẽ ngón trỏ và ngón giữa, lòng bàn tay. Cho 1 tấm bông vào ống canh thang thường và 1 tấm bông vào ống canh thang yếm khí, hơ qua ngọn lửa đèn cồn. Đậy nút ống.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Nuôi cấy và ủ ấm ống canh thang ở 35- 37°C, 16-18 tiếng, khí trường thường.
- Đánh giá độ đục của canh thang.
- Nếu canh thang đục thì nhuộm Gram để nhận định hình thể từng loại vi khuẩn.
- Định danh từng loại vi khuẩn dựa vào các tính chất sinh hóa vật học.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Có vi sinh vật trên bàn tay phẫu thuật viên. Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi sinh vật.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Nếu kết quả xét nghiệm dương tính thì xem xét chất lượng nước rửa tay, qui trình rửa tay, khăn lau tay... để đưa ra những khuyến cáo thích hợp.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
2. Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
3. Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

436. Vi sinh vật cấy kiểm tra dụng cụ đã tiệt trùng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện các vi sinh vật trên dụng cụ y tế đã tiệt trùng còn thời hạn sử dụng để đánh giá quá trình tiệt trùng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi sinh vật được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Thuốc thử khả năng sinh indole của vi khuẩn
- Thuốc thử khả năng sinh oxydase của vi khuẩn
- Thạch máu
- Thạch Mac Conkey
- Canh thang BHI hiếu khí 5ml
- Canh thang BHI yếm khí 5ml
- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Khí Cacbon dioxit (CO₂)
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Cồn 96%
- Dầu soi kính
- Axit ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Nội kiểm chất lượng*

- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Ống nghiệm kích thước 18x180mm
- Lam kính
- Bơm tiêm nhựa
- Đầu tip loại 10 μ L
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giá đựng ống nghiệm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu dụng cụ y tế đã tiệt trùng còn thời hạn sử dụng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 72-120 giờ (3 - 5 ngày) có thể lâu hơn cho các loài vi khuẩn mọc chậm..

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Lấy bệnh phẩm

Dùng 2 que tăm bông vô khuẩn đã được làm ướt bằng nước muối sinh lý 0,9% quệt mạnh như nhau vào mỗi dụng cụ cần kiểm tra và trong thời gian 10 giây. Cho 1 tăm bông vào ống canh thang thường và 1 tăm bông vào ống canh thang yếm khí, hơ qua ngọn lửa đèn cồn. Đậy nút ống.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Nuôi cấy và ủ ấm ống canh thang ở 35- 37°C, 16-18 tiếng, khí trường thường.
- Đánh giá độ đục của canh thang.
- Nếu canh thang đục thì nhuộm Gram để nhận định hình thể từng loại vi khuẩn.
- Định danh từng loại vi khuẩn dựa vào các tính chất sinh vật hóa học.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Có vi sinh vật trên dụng cụ y tế. Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi sinh vật.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Lưu ý lấy mẫu cần tiến hành càng nhanh càng tốt để hạn chế tối đa sự ô nhiễm từ môi trường không khí. Mẫu dụng cụ y tế lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.
- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Nếu kết quả xét nghiệm dương tính thì xem xét các bước khử trùng, tiệt trùng và bảo quản dụng cụ y tế đã tiệt trùng còn thời hạn sử dụng để đưa ra những khuyến cáo thích hợp.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

437. Vi sinh vật cấy kiểm tra bề mặt

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Đánh giá sự hiện diện của các vi sinh vật trên các bề mặt chăm sóc y tế.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi sinh vật được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Thuốc thử khả năng sinh indole của vi khuẩn
- Thuốc thử khả năng sinh oxydase của vi khuẩn
- Thạch máu
- Thạch Mac Conkey
- Canh thang BHI hiếu khí 5ml
- Canh thang BHI yếm khí 5ml
- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Khí Cacbon dioxit (CO₂)
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Cồn 96%
- Dầu soi kính
- Axit ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Nội kiểm chất lượng*
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm

- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Ống nghiệm kích thước 18x180mm
- Lam kính
- Bơm tiêm nhựa
- Đầu tip loại 10 μ L
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giá đựng ống nghiệm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ âm thường
- Tủ âm CO₂
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C

- Bộ pipette các kích cỡ từ 1µl đến 1000µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu các bề mặt chăm sóc y tế.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 72-120 giờ (3 - 5 ngày) có thể lâu hơn cho các loài vi khuẩn mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Lấy bệnh phẩm

Dùng 2 que tăm bông vô khuẩn đã được làm ướt bằng nước muối sinh lý 0,9% quệt mạnh như nhau vào mỗi bề mặt cần kiểm tra và trong thời gian 10 giây. Cho 1 tăm bông vào ống canh thang thường và 1 tăm bông vào ống canh thang yếm khí, hơ qua ngọn lửa đèn cồn. Đậy nút ống.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Nuôi cấy và ủ ấm ống canh thang ở 35- 37°C, 16-18 tiếng, khí trường thường.
- Đánh giá độ đục của canh thang.
- Nếu canh thang đục thì nhuộm Gram để nhận định hình thể từng loại vi khuẩn.
- Định danh từng loại vi khuẩn dựa vào các tính chất sinh vật hóa học.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Có vi sinh vật trên bề mặt. Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi sinh vật.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Lưu ý lấy mẫu cần tiến hành càng nhanh càng tốt để hạn chế tối đa sự ô nhiễm từ môi trường không khí. Mẫu bề mặt lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.
- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Nếu kết quả xét nghiệm dương tính thì xem xét quy trình khử trùng bề mặt, chất lượng nước sát trùng... để đưa ra những khuyến cáo thích hợp.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

438. Vi sinh vật cấy kiểm tra nước sinh hoạt

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Đánh giá số lượng coliform.

Phát hiện vi sinh vật gây hoặc có khả năng gây nhiễm trùng bệnh viện.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi sinh vật được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Thuốc thử khả năng sinh indole của vi khuẩn
- Thuốc thử khả năng sinh oxydase của vi khuẩn
- Thạch máu
- Thạch Mac Conkey
- Canh thang Lactose đặc 10 ml
- Canh thang Lactose loãng 5 ml
- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Khí Cacbon dioxit (CO₂)
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Cồn 96%
- Dầu soi kính
- Axit ngậm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Nội kiểm chất lượng*

- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Ống nghiệm kích thước 18x180mm
- Lam kính
- Bơm tiêm nhựa
- Đầu tip loại 10 μ L
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giá đựng ống nghiệm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1µl đến 1000µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Nước vô trùng rửa tay phẫu thuật, thủ thuật. Nước sinh hoạt tại cơ sở y tế.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 72-120 giờ (3 - 5 ngày) có thể lâu hơn cho các loài vi khuẩn mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1.1. Lấy bệnh phẩm

- Chọn địa điểm, số lượng và thời gian lấy mẫu có thể đánh giá chất lượng vi khuẩn toàn bộ hệ thống cung cấp nước từ đầu nguồn, giữa nguồn và cuối nguồn.
- Mở nước chảy hết cỡ 2-3 phút. Đóng vòi và khử khuẩn kỹ vòi bằng nhiệt độ bùng còn. Mở lại cho chảy mạnh 2-3 phút rồi điều chỉnh chảy vừa đủ để lấy mẫu, tránh không gây bắn ra ngoài. Dùng chai thủy tinh, nút mài vô khuẩn lấy 100 ml cho mục đích kiểm tra chất lượng về vi khuẩn học, 1000ml cho phân tích vi khuẩn gây bệnh. Lấy xong đốt miệng lọ để sát khuẩn và đậy kín ống nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

Bước 1. Định lượng coliform bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN: Most probable number)

- Phương pháp cấy 7 ống:
 - 5 ống canh thang lactose đặc, mỗi ống cấy 10ml nước mẫu ở đậm độ nguyên chất.
 - 1 ống canh thang lactose loãng, cấy 1 ml nước nguyên chất.

- 1 ống canh thang lactose loãng cấy 1ml nước ở đậm độ 10^{-1} hoặc 0,1 ml nước mẫu.
- Hàng thứ 4, 5,... tiếp tục cấy đến đậm độ cần thiết.
- Nuôi cấy và ủ ấm: Ủ ấm 35-37°C trong vòng 48 giờ $\pm$ 3, khí trường thường.
- Đọc kết quả: Những ống lên men lactose sinh acid, chuyển màu môi trường xanh sang vàng và sinh hơi trong ống sinh hơi được coi là dương tính (+). Ghi tất cả những ống (+) theo các đậm độ cấy:
 - 5 ống canh thang lactose đặc, cấy 10ml (+) ghi 5
 - 1 ống canh thang lactose loãng (+) ghi 1
 - 1 ống canh thang lactose loãng (+) ghi 1

Xác định dãy số phương pháp 7 ống là: 5 1 1

Bước 2. Phát hiện vi sinh vật gây bệnh:

- Nuôi cấy và ủ ấm canh thang ở 35-37°C trong vòng 48 giờ $\pm$ 3, khí trường thường.
- Đánh giá độ đục của canh thang.
- Nếu canh thang đục thì nhuộm Gram để nhận định hình thể từng loại vi khuẩn.
- Định danh từng loại vi khuẩn dựa vào các tính chất sinh vật hóa học.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Định lượng Coliform:

Chọn các ống lên men lactose và sinh hơi trong canh thang để xác định được các dãy số. Tra bảng MPN cho phương pháp cấy 7 ống để tính số lượng vi khuẩn/100 ml nước.

4.2.2. Phát hiện vi sinh vật gây bệnh:

- Dương tính: Có vi sinh vật gây bệnh trong nước sinh hoạt. Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi sinh vật.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Coliform là trực khuẩn Gram âm, hiếu khí, kỵ khí tùy tiện, không nha bào, có khả năng lên men lactose sinh acid, sinh hơi ở 35- 370C trong vòng 48 giờ. Chúng được tìm thấy trong phân người, động vật và cả trong môi trường như đất, nước, rau quả... Coliform được coi là chỉ điểm vệ sinh quan trọng. Nồng độ coliform trong nước chứng minh rằng biện pháp khử khuẩn chưa đạt hiệu quả.
- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Khi xét nghiệm mẫu nước có vi khuẩn vượt quá tiêu chuẩn qui định cần áp dụng một số biện pháp can thiệp tạm thời cho đến khi nguồn nước được xử lý.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

439. Vi sinh vật cấy kiểm tra nước thải

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Đánh giá số lượng coliform có trong nước thải sau xử lý tại cơ sở y tế.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi sinh vật được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Thuốc thử khả năng sinh indole của vi khuẩn
- Thuốc thử khả năng sinh oxydase của vi khuẩn
- Thạch máu
- Thạch Mac Conkey
- Canh thang Lactose đặc 10 ml
- Canh thang Lactose loãng 5 ml
- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Khí Cacbon dioxit (CO₂)
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Cồn 96%
- Dầu soi kính
- Axit ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Nước muối sinh lý 5ml
- Nội kiểm chất lượng*

- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Ống nghiệm kích thước 18x180mm
- Lam kính
- Bơm tiêm nhựa
- Đầu tip loại 10 μ L
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giá đựng ống nghiệm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Nước thải sau xử lý tại cơ sở y tế.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 72-120 giờ (3 - 5 ngày) có thể lâu hơn cho các loài vi khuẩn mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Lấy bệnh phẩm

- Chọn địa điểm, số lượng mẫu và thời gian lấy mẫu có thể đánh giá chất lượng vi khuẩn học toàn bộ nguồn nước thải bệnh viện. Thường lấy tại bể tập trung toàn bệnh viện để đánh giá ô nhiễm vi sinh từ đầu nguồn. Lấy mẫu sau từng giai đoạn xử lý và đầu ra sau xử lý. Vì lượng nước thải không đều, nên lấy mẫu vào nhiều thời điểm trong ngày rồi trộn các mẫu lại thành một mẫu gọi là mẫu trộn.
- Dùng quang chai đã khử khuẩn bằng nhiệt độ bùng cồn. Dìm quang chai sâu cách mặt nước 30 cm, khi nước gần đầy chai thì kéo lên để lại trống chừng khoảng 2 - 3 cm từ mặt dưới nút chai trở xuống để tránh nhiễm khuẩn từ miệng nút chai và để khi phân tích lắc trộn mẫu được dễ dàng. Dùng chai thủy tinh, nút mài vô khuẩn lấy 100 ml cho mục đích kiểm tra chất lượng về vi khuẩn học, 1.000ml cho phân tích vi khuẩn gây bệnh. Lấy xong đốt miệng lọ để sát khuẩn và đậy kín ống nghiệm. Khử khuẩn tại miệng chai nút chai, đóng nút nhanh và bao lại miệng chai cẩn thận.
- Nếu không có quang chai, phải rửa tay xà phòng sạch sẽ, lau cồn khử khuẩn tay. Sau đó cầm gần đáy chai, dìm chai xuống nước, đặt chai nằm ngang hơi chúc đầu xuống độ sâu khoảng 15-20 cm để ngang chai tạo dòng nước tự chảy vào miệng chai, tránh lấy nước trên bề mặt. Các thao tác khác thực hiện như đã mô tả ở trên.

- Trường hợp không lấy được trực tiếp, phải dùng xô, gầu múc, cần đổ bỏ 3 lần, lần thứ tư mới rót nhẹ nhàng vào chai sao cho tay không làm nhiễm bẩn mẫu nước.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật định lượng coliform bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN: Most probable number):

Phương pháp cấy nhiều ống:

- Chuẩn bị: Cộ thể xếp 5 hàng, mỗi hàng 3 ống hoặc 5 ống, hàng đầu là những ống canh thang lactose đặc và 2 hàng sau là những ống canh thang lactose loãng.
- Pha loãng: hút vô khuẩn 1ml mẫu nước nguyên cho vào nước muối sinh lý 0,85% chứa 9 ml để có đậm độ pha loãng 10⁻¹. Hút trộn lên xuống 20 - 25 lần để trộn đều mẫu với nước muối. Từ đậm độ này, lại hút 1ml chuyển sang ống nước muối thứ 2, có đậm độ pha loãng 10⁻². Cứ như thế pha loãng tới đậm độ cần thiết. Mỗi đậm độ thay pipet mới.
 - Hàng thứ nhất xếp 3 ống canh thang lactose đặc, cấy mỗi ống 10 ml nước mẫu.
 - Hàng thứ 2 xếp 3 ống canh thang lactose loãng, cấy mỗi ống 1 ml mẫu nước.
 - Hàng thứ 3 xếp 3 ống canh thang lactose loãng, cấy mỗi ống 1 ml mẫu nước đậm độ 10⁻¹.
 - Hàng thứ 4, 5,... tiếp tục cấy đến đậm độ cần thiết.
- Nuôi cấy và ủ ấm 35-37°C trong vòng 48 giờ ± 3, khí trường thường.
- Đọc kết quả: Những ống lên men lactose sinh acid, chuyển màu môi trường xanh sang vàng và sinh hơi trong ống sinh hơi được coi là dương tính (+). Ghi tất cả những ống (+) theo các đậm độ cấy:

▪ 3 ống canh thang lactose đặc, cấy 10 ml, (+) cả 3	ghi 3
▪ 3 ống canh thang lactose loãng, cấy 1 ml nước (+) cả 3	ghi 3
▪ 3 ống canh thang lactose, loãng, cấy 1 ml nước 10 ⁻¹ (+) cả 3	ghi 3
▪ 3 ống canh thang lactose loãng, cấy 1 ml nước 10 ⁻² , chỉ (+) 2	ghi 2
▪ 3 ống canh thang lactose loãng, cấy 1 ml nước 10 ⁻³ , (-) cả 3	ghi 0
- Xác định dãy số phương pháp nhiều ống là: 3 3 3 2 0

4.2. Nhận định kết quả

Định lượng Coliform: Chọn các ống lên men lactose và sinh hơi trong canh thang để xác định được các dãy số. Tra bảng MPN cho phương pháp cấy 9 ống hoặc 15 ống để tính số lượng vi khuẩn/100 ml nước.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Nếu xét nghiệm mẫu nước thải có số lượng coliform vượt quá tiêu chuẩn qui định cần áp dụng một số biện pháp can thiệp tạm thời cho đến khi nguồn nước được xử lý.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

440. Vi khuẩn kháng thuốc - Phát hiện người mang

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện chủng vi khuẩn kháng thuốc cư trú ở người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Ở một số bệnh nhân hoặc nhân viên y tế có thể mang các chủng vi khuẩn kháng thuốc nhưng không gây bệnh cảnh nhiễm trùng. Tuy nhiên, đây lại có thể là nguồn gốc gây nhiễm trùng bệnh viện. Sàng lọc phát hiện người mang chủng vi khuẩn kháng thuốc có ý nghĩa trong chiến lược kiểm soát nhiễm trùng bệnh viện.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Thanh thấm kháng sinh Etest
- Khoanh giấy kháng sinh
- Thuốc thử khả năng sinh indole của vi khuẩn
- Thuốc thử khả năng sinh oxydase của vi khuẩn
- Thạch máu
- Thạch Chocolate
- Thạch Muller Hinton
- Thạch thường
- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Khí Cacbon dioxit (CO₂)
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Cồn 96%
- Dầu soi kính
- Axit ngâm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay

- Dung dịch khử trùng
- Nước muối sinh lý 5ml
- Nội kiểm chất lượng*
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Ống nghiệm kích thước 18x180mm
- Que cấy vô trùng nhựa 1 μ l 10 μ l
- Ống đựng máu No Additive
- Lam kính
- Bơm tiêm nhựa
- Đầu tip loại 10 μ L
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giá đựng ống nghiệm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ âm thường
- Tủ âm CO₂
- Hệ thống định danh tự động
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy

- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm lấy ở ngoài da, niêm mạc bằng tăm bông hoặc tăm bông thấm nước muối sinh lý vô trùng.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 336 giờ (14 ngày).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Cấy bệnh phẩm lên môi trường phân lập và môi trường canh thang tăng sinh
- Ủ ấm qua đêm
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ
- Nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng hệ thống tự động.

- Thử nghiệm kháng sinh đồ khoanh giấy khuếch tán
- Thử nghiệm kháng sinh đồ MIC.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn kháng thuốc liên quan đến nguồn gốc nhiễm trùng bệnh viện như MRSA, VRE... Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ loài và đặc tính kháng thuốc của vi khuẩn.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn gây bệnh

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

441. Vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện - Phát hiện nguồn nhiễm

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện nguồn gốc chủng vi khuẩn gây thường gây nhiễm trùng bệnh viện cư trú.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Ở một số bệnh nhân, nhân viên y tế, vật dụng y tế hoặc các yếu tố trong môi trường bệnh viện có thể chứa đựng các chủng vi khuẩn có khả năng gây nhiễm trùng bệnh viện. Sàng lọc phát hiện nguồn mang các chủng vi khuẩn này có ý nghĩa trong chiến lược kiểm soát nhiễm trùng bệnh viện.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Hóa chất định danh tùy theo từng loại thiết bị sử dụng
- Thuốc thử khả năng sinh indole của vi khuẩn
- Thuốc thử khả năng sinh oxydase của vi khuẩn
- Thạch máu
- Thạch Chocolate
- Bộ thuốc nhuộm Gram
- Khí Cacbon dioxit (CO₂)
- Cồn 70%
- Cồn 90%
- Cồn 96%
- Dầu soi kính
- Axit ngậm lam
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Nước muối sinh lý 5ml
- Nội kiểm chất lượng*
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm

- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Ống nghiệm kích thước 18x180mm
- Que cấy vô trùng nhựa 1μl 10μl
- Ống đựng máu No Additive
- Lam kính
- Bơm tiêm nhựa
- Đầu tip loại 10 μL
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Hộp đựng lam kính 100 vị trí
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giá đựng ống nghiệm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Hệ thống định danh tự động
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống định danh

- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm lấy ở các vị trí, các nguồn nghi ngờ có mang vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 72-120 giờ (3 - 5 ngày) có thể lâu hơn cho các loài vi khuẩn mọc chậm.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- Cấy bệnh phẩm lên môi trường phân lập và môi trường canh thang tăng sinh
- Ủ ấm qua đêm
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ
- Nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng hệ thống tự động.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn có khả năng gây nhiễm trùng bệnh viện. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn nghi ngờ gây nhiễm trùng bệnh viện.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

442. Vi sinh vật định danh PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của một số căn nguyên vi sinh vật thường gặp trực tiếp từ các bệnh phẩm lâm sàng bằng kỹ thuật Nested PCR (PCR lồng).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật PCR lồng đa tác nhân (nested multiplex PCR) trên hệ thống máy hoàn toàn tự động:

- Ly giải mẫu bằng cách khuấy (tạo hạt)
- Tách chiết và tinh sạch tất cả các axit nucleic từ mẫu bằng công nghệ hạt từ.
- Thực hiện PCR lồng đa tác nhân bằng cách:
 - + Đầu tiên thực hiện phiên mã ngược và phản ứng đa chuỗi thể tích lớn, đơn lẻ.
 - + Sau đó thực hiện nhiều phản ứng PCR giai đoạn hai đơn lẻ để khuếch đại các trình tự trong sản phẩm PCR1.

Hệ thống máy sử dụng dữ liệu đường cong nóng chảy điểm cuối để phát hiện và tạo kết quả cho từng mục tiêu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ Vi sinh, Bác sĩ xét nghiệm, kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm chẩn đoán PCR đa tác nhân (Ví dụ hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Ống môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Tăm bông vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm

- Giấy thấm không bụi
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tắm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm sinh học từ người (Ví dụ: Đờm, dịch tỵ hầu, dịch não tủy, nước tiểu, phân, máu....)

- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 90 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bước 1: Chuẩn bị túi hóa chất

- Cho túi hóa chất vào trong trạm chuẩn bị mẫu
- Đặt lọ để tiêm mẫu bệnh phẩm (màu đỏ) vào giếng màu đỏ
- Đặt lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất (màu xanh) vào giếng màu xanh

Bước 2: Hòa tan hóa chất

- Xoáy để mở lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất
- Tiêm vào ống chứa dịch hòa tan của túi hóa chất
- Đợi tới khi hóa chất hòa tan trong tất cả các ống thì rút kim ra trả về lọ đựng dung dịch ban đầu.

Bước 3: Trộn mẫu bệnh phẩm vào túi hóa chất

- Thêm toàn bộ ống dung dịch đệm vào lọ để tiêm mẫu
- Dùng pipet chuyển mẫu bệnh phẩm vào trong lọ này
- Nắp chặt, bỏ ra khỏi giếng và trộn bằng cách lắc lên 3 lần
- Đặt lại vị trí giếng màu đỏ

Bước 4: Nạp mẫu bệnh phẩm

- Xoay vòng mở nắp kim của lọ tiêm mẫu

- Tiêm toàn bộ lọ vào giếng chuẩn đầu tiên
- Đẩy mạnh toàn bộ dung dịch vào trong túi hóa chất

Bước 5: Bắt đầu chạy máy, vận hành các hệ thống theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

Phần mềm tự động mở bản báo cáo kết quả khi xét nghiệm hoàn tất.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Kiểm soát chất lượng: RNA Process Control (Chứng kiểm soát quá trình RNA), PCR2 Control (Chứng PCR2). Cả hai xét nghiệm kiểm soát (chứng) phải dương tính để chu trình xét nghiệm được coi là đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

443. Vi sinh vật nhiễm khuẩn huyết PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của một số căn nguyên vi sinh vật thường gặp và một số gene kháng kháng sinh của vi khuẩn trực tiếp từ các bệnh phẩm lâm sàng (mẫu cấy máu được xác định là dương tính bởi hệ thống cấy máu) bằng kỹ thuật PCR lồng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật PCR lồng đa tác nhân (nested multiplex PCR) trên hệ thống máy hoàn toàn tự động:

- Ly giải mẫu bằng cách khuấy (tạo hạt)
- Tách chiết và tinh sạch tất cả các axit nucleic từ mẫu bằng công nghệ hạt từ.
- Thực hiện PCR lồng đa tác nhân bằng cách:
 - + Đầu tiên thực hiện phiên mã ngược và phản ứng đa chuỗi thể tích lớn, đơn lẻ.
 - + Sau đó thực hiện nhiều phản ứng PCR giai đoạn hai đơn lẻ để khuếch đại các trình tự trong sản phẩm PCR1.
- Hệ thống máy sử dụng dữ liệu đường cong nóng chảy điểm cuối để phát hiện và tạo kết quả cho từng mục tiêu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Bơm kim tiêm 5 ml vô trùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm không bụi

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Hệ thống máy PCR tự động
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20 °C hoặc -70 °C)
- Micropipette
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Bệnh phẩm mẫu cấy máu được xác định là dương tính bởi hệ thống cấy máu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 180 phút (3 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị túi hóa chất: - Cho túi hóa chất vào trong trạm chuẩn bị mẫu - Đặt lọ để tiêm mẫu bệnh phẩm (màu đỏ) vào giếng màu đỏ - Đặt lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất (màu xanh) vào giếng màu xanh
2	Hòa tan hóa chất - Xoáy để mở lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất - Tiêm vào ống chứa dịch hòa tan của túi hóa chất - Đợi tới khi hóa chất hòa tan trong tất cả các ống thì rút kim ra trả về lọ đựng dung dịch ban đầu.
3	Trộn mẫu bệnh phẩm vào túi hóa chất - Lật ngược chai cấy máu dương tính nhiều lần để trộn kỹ. Lau sạch vách ngăn chai bằng cồn và để khô. Sử dụng ống tiêm, rút 0,2 mL mẫu cấy máu qua vách ngăn chai, thận trọng để tránh hình thành bọt. Thêm mẫu trực tiếp vào Sample Buffer (Chất đệm mẫu) trong Sample Injection Vial (Lọ tiêm mẫu). - Dùng pipet chuyển mẫu bệnh phẩm vào trong lọ này - Nắp chặt, bỏ ra khỏi giếng và trộn bằng cách lắc lên 3 lần - Đặt lại vị trí giếng màu đỏ
4	Nạp mẫu bệnh phẩm - Xoay vòng mở nắp kim của lọ tiêm mẫu - Tiêm toàn bộ lọ vào giếng chuẩn đầu tiên - Đẩy mạnh toàn bộ dung dịch vào trong túi hóa chất
5	Bắt đầu chạy máy Vận hành hệ thống theo hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Khi phản ứng kết thúc, tháo túi hóa chất chạy xét nghiệm, bệnh phẩm vào thùng chứa rác thải y tế.

4.2. Nhận định kết quả

- Phần mềm tự động mở bản báo cáo kết quả khi xét nghiệm hoàn tất.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

- Kết quả xét nghiệm được xem là hợp lệ nếu các thông số sau đáp ứng các điều kiện:

- Cả hai chứng RNA Process Control và PCR2 Control phải dương tính để chu trình xét nghiệm được coi là đạt yêu cầu. Khi đó máy sẽ báo Passed ở trường control (mẫu chứng).

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

444. Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp trên PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của một số căn nguyên vi sinh vật (vi rút, vi khuẩn không điển hình) thường gặp trực tiếp từ các bệnh phẩm lâm sàng (dịch tỵ hầu, dịch ngoáy mũi họng) bằng kỹ thuật PCR lồng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật PCR lồng đa tác nhân (nested multiplex PCR) trên hệ thống máy hoàn toàn tự động:

- Ly giải mẫu bằng cách khuấy (tạo hạt)
- Tách chiết và tinh sạch tất cả các axit nucleic từ mẫu bằng công nghệ hạt từ.
- Thực hiện PCR lồng đa tác nhân bằng cách:
 - + Đầu tiên thực hiện phiên mã ngược và phản ứng đa chuỗi thể tích lớn, đơn lẻ.
 - + Sau đó thực hiện nhiều phản ứng PCR giai đoạn hai đơn lẻ để khuếch đại các trình tự trong sản phẩm PCR1.
- Hệ thống máy sử dụng dữ liệu đường cong nóng chảy điểm cuối để phát hiện và tạo kết quả cho từng mục tiêu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Ống môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Tăm bông vô trùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giấy thấm không bụi

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20 °C hoặc -70 °C)
- Micropipette
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch tỵ hầu, dịch ngoáy mũi họng (trong môi trường vận chuyển), yêu cầu thể tích theo quy định của bộ sinh phẩm xét nghiệm.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 120 phút (2 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	<i>Chuẩn bị túi hóa chất</i>

Các bước	Nội dung
	- Cho túi hóa chất vào trong trạm chuẩn bị mẫu - Đặt lọ để tiêm mẫu bệnh phẩm (màu đỏ) vào giếng màu đỏ - Đặt lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất (màu xanh) vào giếng màu xanh
2	Hòa tan hóa chất - Xoáy để mở lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất - Tiêm vào ống chứa dịch hòa tan của túi hóa chất - Đợi tới khi hóa chất hòa tan trong tất cả các ống thì rút kim ra trả về lọ đựng dung dịch ban đầu.
3	Trộn mẫu bệnh phẩm vào túi hóa chất - Thêm toàn bộ ống dung dịch đệm vào lọ để tiêm mẫu - Dùng pipet chuyển mẫu bệnh phẩm vào trong lọ này - Nắp chặt, bỏ ra khỏi giếng và trộn bằng cách lắc lên 3 lần - Đặt lại vị trí giếng màu đỏ
4	Nạp mẫu bệnh phẩm - Xoay vòng mở nắp kim của lọ tiêm mẫu - Tiêm toàn bộ lọ vào giếng chuẩn đầu tiên - Đẩy mạnh toàn bộ dung dịch vào trong túi hóa chất
5	Bắt đầu chạy máy Vận hành hệ thống theo hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Khi phản ứng kết thúc, tháo túi hóa chất chạy xét nghiệm, bệnh phẩm vào thùng chứa rác thải y tế.

4.2. Nhận định kết quả

Phần mềm tự động hiển thị bản báo cáo kết quả khi xét nghiệm hoàn tất.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Kết quả xét nghiệm được xem là hợp lệ nếu các thông số sau đáp ứng các điều kiện:

- Cả hai chứng RNA Process Control và PCR2 Control phải dương tính để chu trình xét nghiệm được coi là đạt yêu cầu. Khi đó máy sẽ báo Passed ở trường control (mẫu chứng).

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

445. Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp dưới PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của một số căn nguyên vi sinh vật và một số gene kháng kháng sinh của vi khuẩn thường gặp trực tiếp từ các bệnh phẩm lâm sàng (dịch phế quản, đờm, dịch phế nang) bằng kỹ thuật PCR lồng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật PCR lồng đa tác nhân (nested multiplex PCR) trên hệ thống máy hoàn toàn tự động:

- Ly giải mẫu bằng cách khuấy (tạo hạt)
- Tách chiết và tinh sạch tất cả các axit nucleic từ mẫu bằng công nghệ hạt từ.
- Thực hiện PCR lồng đa tác nhân bằng cách:
 - + Đầu tiên thực hiện phiên mã ngược và phản ứng đa chuỗi thể tích lớn, đơn lẻ.
 - + Sau đó thực hiện nhiều phản ứng PCR giai đoạn hai đơn lẻ để khuếch đại các trình tự trong sản phẩm PCR1.
- Hệ thống máy sử dụng dữ liệu đường cong nóng chảy điểm cuối để phát hiện và tạo kết quả cho từng mục tiêu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giấy thấm không bụi
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Hệ thống máy PCR tự động.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20 °C hoặc -70 °C)
- Micropipette
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch phế quản, đờm, dịch phế nang.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 120 phút (2 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị túi hóa chất - Cho túi hóa chất vào trong trạm chuẩn bị mẫu - Đặt lọ để tiêm mẫu bệnh phẩm (màu đỏ) vào giếng màu đỏ - Đặt lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất (màu xanh) vào giếng màu xanh
2	Hòa tan hóa chất - Xoáy để mở lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất - Tiêm vào ống chứa dịch hòa tan của túi hóa chất - Đợi tới khi hóa chất hòa tan trong tất cả các ống thì rút kim ra trả về lọ đựng dung dịch ban đầu.
3	Trộn mẫu bệnh phẩm vào túi hóa chất - Thêm toàn bộ ống dung dịch đệm vào lọ để tiêm mẫu - Sử dụng Sample Swab (Que khuấy mẫu) được cung cấp trong bộ công cụ xét nghiệm, tiến hành khuấy kỹ mẫu bệnh phẩm BAL hoặc đờm trong khoảng 10 giây. Đặt đầu khuấy của Sample Swab (Que khuấy mẫu) vào Sample Injection Vial (Lọ tiêm mẫu) rồi bẻ gãy tay cầm của que khuấy. - Nấp chặt, bỏ ra khỏi giếng và trộn bằng cách lắc lên 3 lần - Đặt lại vị trí giếng màu đỏ
4	Nạp mẫu bệnh phẩm - Xoay vòng mở nắp kim của lọ tiêm mẫu - Tiêm toàn bộ lọ vào giếng chuẩn đầu tiên - Đẩy mạnh toàn bộ dung dịch vào trong túi hóa chất
5	Bắt đầu chạy máy Vận hành hệ thống theo hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Khi phản ứng kết thúc, tháo túi hóa chất chạy xét nghiệm, bệnh phẩm vào thùng chứa rác thải y tế.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Khi PCR2 hoàn tất, thiết bị thực hiện phân tích đường cong nóng chảy DNA trên các sản phẩm PCR và đo tín hiệu huỳnh quang được tạo ra trong mỗi giếng. Sau đó, phần mềm sẽ thực hiện một số phân tích và ấn định kết quả xét nghiệm cuối cùng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

446. Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường tiêu hóa PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của một số căn nguyên vi sinh vật thường gặp trực tiếp từ các bệnh phẩm lâm sàng (Phân, mẫu phân trong môi trường vận chuyển) bằng kỹ thuật PCR lồng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật PCR lồng đa tác nhân (nested multiplex PCR) trên hệ thống máy hoàn toàn tự động:

- Ly giải mẫu bằng cách khuấy (tạo hạt)
- Tách chiết và tinh sạch tất cả các axit nucleic từ mẫu bằng công nghệ hạt từ.
- Thực hiện PCR lồng đa tác nhân bằng cách:
 - + Đầu tiên thực hiện phiên mã ngược và phản ứng đa chuỗi thể tích lớn, đơn lẻ.
 - + Sau đó thực hiện nhiều phản ứng PCR giai đoạn hai đơn lẻ để khuếch đại các trình tự trong sản phẩm PCR1.
- Hệ thống máy sử dụng dữ liệu đường cong nóng chảy điểm cuối để phát hiện và tạo kết quả cho từng mục tiêu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Ống môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Tăm bông vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng

- Giấy thấm không bụi
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Hệ thống máy PCR tự động.
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20 °C hoặc -70 °C)
- Micropipette
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Phân tươi, phân trong môi trường vận chuyển (VD: Cary Blair).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 120 phút (2 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị túi hóa chất - Cho túi hóa chất vào trong trạm chuẩn bị mẫu - Đặt lọ để tiêm mẫu bệnh phẩm (màu đỏ) vào giếng màu đỏ - Đặt lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất (màu xanh) vào giếng màu xanh
2	Hòa tan hóa chất - Xoáy để mở lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất - Tiêm vào ống chứa dịch hòa tan của túi hóa chất - Đợi tới khi hóa chất hòa tan trong tất cả các ống thì rút kim ra trả về lọ đựng dung dịch ban đầu.
3	Trộn mẫu bệnh phẩm vào túi hóa chất - Thêm toàn bộ ống dung dịch đệm vào lọ để tiêm mẫu - Dùng pipet chuyển mẫu bệnh phẩm vào trong lọ này - Nắp chặt, bỏ ra khỏi giếng và trộn bằng cách lắc lên 3 lần - Đặt lại vị trí giếng màu đỏ
4	Nạp mẫu bệnh phẩm - Xoay vòng mở nắp kim của lọ tiêm mẫu - Tiêm toàn bộ lọ vào giếng chuẩn đầu tiên - Đẩy mạnh toàn bộ dung dịch vào trong túi hóa chất
5	Bắt đầu chạy máy Vận hành hệ thống theo hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Khi phản ứng kết thúc, tháo túi hóa chất chạy xét nghiệm, bệnh phẩm vào thùng chứa rác thải y tế.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

- Báo cáo kết quả trên hệ thống máy xét nghiệm được tự động hiển thị sau khi hoàn thành quá trình chạy. Phần Tóm tắt Kết quả của báo cáo thử nghiệm liệt kê kết quả cho từng mục tiêu được thử nghiệm. Các kết quả có thể có đối với mỗi sinh vật là:
 - + Có phát hiện
 - + Không phát hiện
 - + Không áp dụng (N/A)

+ Không hợp lệ.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

447. Vi sinh vật nhiễm khuẩn não-màng não PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của một số căn nguyên vi sinh vật thường gặp trực tiếp từ các bệnh phẩm lâm sàng (Dịch não tủy) bằng kỹ thuật PCR lồng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật PCR lồng đa tác nhân (nested multiplex PCR) trên hệ thống máy hoàn toàn tự động:

- Ly giải mẫu bằng cách khuấy (tạo hạt)
- Tách chiết và tinh sạch tất cả các axit nucleic từ mẫu bằng công nghệ hạt từ.
- Thực hiện PCR lồng đa tác nhân bằng cách:
 - + Đầu tiên thực hiện phiên mã ngược và phản ứng đa chuỗi thể tích lớn, đơn lẻ.
 - + Sau đó thực hiện nhiều phản ứng PCR giai đoạn hai đơn lẻ để khuếch đại các trình tự trong sản phẩm PCR1.
- Hệ thống máy sử dụng dữ liệu đường cong nóng chảy điểm cuối để phát hiện và tạo kết quả cho từng mục tiêu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh (5 ml/lần x 3 người)
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ nhựa vô trùng đựng bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giấy thấm không bụi

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Vd: Hệ thống máy xét nghiệm PCR và phần mềm (VD hoặc hệ thống tương đương)
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Dịch não tủy, dịch tủy sống không ly tâm.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 120 phút (2 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị túi hóa chất - Cho túi hóa chất vào trong trạm chuẩn bị mẫu - Đặt lọ để tiêm mẫu bệnh phẩm (màu đỏ) vào giếng màu đỏ - Đặt lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất (màu xanh) vào giếng màu xanh
2	Hòa tan hóa chất - Xoáy để mở lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất - Tiêm vào ống chứa dịch hòa tan của túi hóa chất - Đợi tới khi hóa chất hòa tan trong tất cả các ống thì rút kim ra trả về lọ đựng dung dịch ban đầu.
3	Trộn mẫu bệnh phẩm vào túi hóa chất - Thêm toàn bộ ống dung dịch đệm vào lọ để tiêm mẫu - Dùng pipet chuyển mẫu bệnh phẩm vào trong lọ này - Nắp chặt, bỏ ra khỏi giếng và trộn bằng cách lắc lên 3 lần - Đặt lại vị trí giếng màu đỏ
4	Nạp mẫu bệnh phẩm - Xoay vòng mở nắp kim của lọ tiêm mẫu - Tiêm toàn bộ lọ vào giếng chuẩn đầu tiên - Đẩy mạnh toàn bộ dung dịch vào trong túi hóa chất
5	Bắt đầu chạy máy Vận hành hệ thống theo hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Khi phản ứng kết thúc, tháo túi hóa chất chạy xét nghiệm, bệnh phẩm vào thùng chứa rác thải y tế.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

- Kiểm soát chất lượng: Chứng kiểm soát quá trình RNA (Process Control -Chứng kiểm soát quá trình RNA). PCR2 Control (Chứng PCR2). Cả hai chứng phải dương tính để chu trình xét nghiệm được coi là đạt yêu cầu (thực hiện theo hướng dẫn nhà sản xuất).

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

- Phần mềm tự động mở bản báo cáo kết quả khi xét nghiệm hoàn tất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử..

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.

3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

448. Vi sinh vật nhiễm khuẩn khớp PCR lồng đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt của một số căn nguyên vi sinh vật thường gặp trực tiếp từ chất lỏng hoạt dịch thu được từ những người nghi ngờ bị nhiễm trùng khớp bằng kỹ thuật PCR lồng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật PCR lồng đa tác nhân (nested multiplex PCR) trên hệ thống máy hoàn toàn tự động:

- Ly giải mẫu bằng cách khuấy (tạo hạt)
- Tách chiết và tinh sạch tất cả các axit nucleic từ mẫu bằng công nghệ hạt từ.
- Thực hiện PCR lồng đa tác nhân bằng cách:
 - + Đầu tiên thực hiện phiên mã ngược và phản ứng đa chuỗi thể tích lớn, đơn lẻ.
 - + Sau đó thực hiện nhiều phản ứng PCR giai đoạn hai đơn lẻ để khuếch đại các trình tự trong sản phẩm PCR1.
- Hệ thống máy sử dụng dữ liệu đường cong nóng chảy điểm cuối để phát hiện và tạo kết quả cho từng mục tiêu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Ống môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Tăm bông vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng

- Giấy thấm không bụi
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/ năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/ năm)
- Khăn lau tay
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy PCR tự động
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C hoặc -70°C)
- Micropipette
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm sinh học từ người (chất lỏng hoạt dịch thu được từ những người nghi ngờ bị nhiễm trùng khớp).
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 90 phút (1,5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Chuẩn bị túi hóa chất - Cho túi hóa chất vào trong trạm chuẩn bị mẫu - Đặt lọ để tiêm mẫu bệnh phẩm (màu đỏ) vào giếng màu đỏ - Đặt lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất (màu xanh) vào giếng màu xanh
2	Hòa tan hóa chất - Xoáy để mở lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất - Tiêm vào ống chứa dịch hòa tan của túi hóa chất - Đợi tới khi hóa chất hòa tan trong tất cả các ống thì rút kim ra trả về lọ đựng dung dịch ban đầu.
3	Trộn mẫu bệnh phẩm vào túi hóa chất - Thêm toàn bộ ống dung dịch đệm vào lọ để tiêm mẫu - Dùng pipet chuyển mẫu bệnh phẩm vào trong lọ này - Nắp chặt, bỏ ra khỏi giếng và trộn bằng cách lắc lên 3 lần - Đặt lại vị trí giếng màu đỏ
4	Nạp mẫu bệnh phẩm - Xoay vòng mở nắp kim của lọ tiêm mẫu - Tiêm toàn bộ lọ vào giếng chuẩn đầu tiên - Đẩy mạnh toàn bộ dung dịch vào trong túi hóa chất
5	Bắt đầu chạy máy Vận hành hệ thống theo hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Khi phản ứng kết thúc, tháo túi hóa chất chạy xét nghiệm, bệnh phẩm vào thùng chứa rác thải y tế.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

Kiểm soát chất lượng: RNA Process Control (Chứng kiểm soát quá trình RNA), PCR2 Control (Chứng PCR2). Cả hai xét nghiệm kiểm soát (chứng) phải dương tính để chu trình xét nghiệm được coi là đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

- Báo cáo kết quả trên hệ thống máy xét nghiệm được tự động hiển thị sau khi hoàn thành quá trình chạy. Phần Tóm tắt Kết quả của báo cáo thử nghiệm liệt kê kết quả cho từng mục tiêu được thử nghiệm. Các kết quả có thể có đối với mỗi sinh vật là:
 - + Có phát hiện

- + Không phát hiện
- + Không áp dụng (N/A)
- + Không hợp lệ.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.
- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.

2. Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
3. Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành *Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

449. *Mycoplasma hominis* nuôi cấy, định danh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nuôi cấy và định danh *Mycoplasma hominis* từ dịch sinh dục.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm

- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường Mycoplasma IST3
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0.9%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đèn cồn
- Tăm bông vô trùng
- Khẩu trang, găng tay y tế
- Giấy lau bề mặt
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chống đông.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 48-72 giờ (2 – 3 ngày).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Ghi thông tin mẫu bệnh phẩm ống dung dịch R1

- Với bệnh phẩm nước tiểu hoặc chất lỏng thể tích trên 200 μl , lấy 200 μl bệnh phẩm chuyển vào dung dịch R1.
- Với bệnh phẩm chất lỏng thể tích trên 100 μl và dưới 200 μl , trộn dung dịch R1 và R2 để thu được canh thang Urea-Arginine LYO 2, điều chỉnh để lấy tỷ lệ canh thang và bệnh phẩm bằng nhau.
- Với bệnh phẩm tăm bông lấy bệnh phẩm dịch niệu đạo/dịch cổ tử cung, ngâm vào dung dịch R1
- Lấy thanh thử ra để ở nhiệt độ phòng, ghi mã số bệnh phẩm hoặc tên tuổi bệnh nhân.
- Trộn dung dịch R1 vào R2, vortex đến khi tan hoàn toàn
- Hút 55 μl dung dịch vào mỗi giếng thử đã đánh dấu trên khay thử
- Nhỏ vào mỗi giếng đánh dấu 2 giọt dầu paraffin
- Đậy nắp khay thử và lọ canh thang, ủ trong tủ ấm với nhiệt độ 37°C
- Đọc kết quả sau 48 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: không có sự đổi màu (màu vàng nhạt) Dương tính: có sự đổi màu (cam, đỏ cam hoặc đỏ, đỏ hồng), canh thang thì không phiên giải
- Nhận định sự có mặt của vi khuẩn ở giếng thử 0, Mh
 - + Canh thang Urea-Arginine LYO đục thì không phiên giải
 - + MH dương tính: có sự đổi màu ở giếng 0 và Mh
 - + Không phiên giải nếu âm tính ở giếng 0
 - + Không phiên giải nếu dương tính ở giếng 0 và các giếng cupule dương tính ngẫu nhiên
- Nếu hiệu giá thấp chỉ có dương tính ở canh thang Urea-Arginine LYO mà không có ở giếng 0 thì phiên giải âm tính
- Nêu rõ kết quả thu được: có hay không có vi khuẩn *Mycoplasma hominis* mọc.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Các yếu tố có thể làm sai lệch kết quả xét nghiệm như do thời gian, nhiệt độ ủ thanh test không đúng, hóa chất quá hạn sử dụng hoặc các dụng cụ lấy mẫu bị nhiễm bẩn

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. CLSI M43, *Methods for antimicrobial susceptibility testing for Human Mycoplasma*, approved guideline- M43-A, 2015.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

450. *Ureaplasma urealyticum* nuôi cấy, định danh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nuôi cấy và định danh vi khuẩn *Ureaplasma urealyticum* từ dịch sinh dục.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường Mycoplasma IST3
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0.9%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đèn cồn
- Khẩu trang, găng tay y tế
- Giấy lau bề mặt
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ ấm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chống đông.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 48 - 96 giờ (2 - 4 ngày).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Lấy bệnh phẩm: theo quy trình phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Ghi thông tin mẫu bệnh phẩm ống dung dịch R1
- Với bệnh phẩm nước tiểu hoặc chất lỏng thể tích trên 200 µl, lấy 200 µl bệnh phẩm chuyển vào dung dịch R1.

- Với bệnh phẩm chất lỏng thể tích trên 100 μ l và dưới 200 μ l, trộn dung dịch R1 và R2 để thu được canh thang Urea-Arginine LYO 2, điều chỉnh để lấy tỷ lệ canh thang và bệnh phẩm bằng nhau.
- Với bệnh phẩm tằm bông lấy bệnh phẩm dịch niệu đạo/dịch cổ tử cung, ngâm vào dung dịch R1
- Lấy thanh thử ra để ở nhiệt độ phòng, ghi mã số bệnh phẩm hoặc tên tuổi bệnh nhân.
- Trộn dung dịch R1 vào R2, vortex đến khi tan hoàn toàn
- Hút 55 μ l dung dịch vào mỗi giếng thử đã đánh dấu trên khay thử
- Nhỏ vào mỗi giếng đánh dấu 2 giọt dầu paraffin
- Đậy nắp khay thử và lọ canh thang, ủ trong tủ ấm với nhiệt độ 37°C
- Đọc kết quả sau 48 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: không có sự đổi màu (màu vàng nhạt) Dương tính: có sự đổi màu (cam, đỏ cam hoặc đỏ, đỏ hồng), canh thang thì không phiên giải
- Nhận định sự có mặt của vi khuẩn ở giếng thử 0, Uspp
 - + Canh thang Urea-Arginine LYO đục thì không phiên giải
 - + Uspp dương tính: có sự đổi màu ở giếng 0 và Uspp
 - + Không phiên giải nếu âm tính ở giếng 0
 - + Không phiên giải nếu dương tính ở giếng 0 và các giếng cupule dương tính ngẫu nhiên
- Nếu hiệu giá thấp chỉ có dương tính ở canh thang Urea-Arginine LYO mà không có ở giếng 0 thì phiên giải âm tính
- Nhận định kết quả kháng sinh đồ với *Ureaplasma urealyticum*: chỉ đọc kết quả khi có dương tính với vi khuẩn *Ureaplasma urealyticum* (giếng 0 dương tính)
 - + Có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: R
 - + Với *Ureaplasma spp.*, có sự đổi màu ở 1 trong 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: dương tính với nồng độ thấp và âm tính với nồng độ cao của tất cả kháng sinh trừ Tetracycline được hiểu là kháng (R), với Tetracycline được hiểu là nhạy (S)
 - + Giếng kháng sinh dương tính ở nồng độ cao và âm tính ở nồng độ thấp thì không phiên giải và thực hiện lại xét nghiệm
 - + Không có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: (S)

- Nêu rõ kết quả thu được: có hay không có vi khuẩn *Ureaplasma urealyticum* mọc, nhạy/kháng với từng loại kháng sinh trong panel

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Các yếu tố có thể làm sai lệch kết quả xét nghiệm như do thời gian, nhiệt độ ủ thanh test không đúng, hóa chất quá hạn sử dụng hoặc các dụng cụ lấy mẫu bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.

2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. CLSI M43, *Methods for antimicrobial susceptibility testing for Human Mycoplasma*, approved guideline- M43-A, 2015.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

451. *Mycoplasma hominis* kháng thuốc

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định tính kháng thuốc của vi khuẩn *Mycoplasma hominis* nuôi cấy từ dịch sinh dục.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *M. hominis* và *Ureaplasma* spp. được xác định bằng phương pháp cấy trong canh thang đã có sẵn lượng kháng sinh nhất định. Đánh giá mức độ nhạy cảm với kháng sinh tùy theo khả năng mọc của vi khuẩn trong môi trường có chứa kháng sinh.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường Mycoplasma IST3
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0.9%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đèn cồn
- Tăm bông vô trùng
- Khẩu trang, găng tay y tế
- Giấy lau bề mặt
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm

- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ ấm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chống đông.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 48-72 giờ (2 - 3 ngày)

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Ghi thông tin mẫu bệnh phẩm ống dung dịch R1
- Với bệnh phẩm nước tiểu hoặc chất lỏng thể tích trên 200 μ l, lấy 200 μ l bệnh phẩm chuyển vào dung dịch R1.
- Với bệnh phẩm chất lỏng thể tích trên 100 μ l và dưới 200 μ l, trộn dung dịch R1 và R2 để thu được canh thang Urea-Arginine LYO 2, điều chỉnh để lấy tỷ lệ canh thang và bệnh phẩm bằng nhau.
- Với bệnh phẩm tăm bông lấy bệnh phẩm dịch niệu đạo/dịch cổ tử cung, ngâm vào dung dịch R1
- Lấy thanh thử ra để ở nhiệt độ phòng, ghi mã số bệnh phẩm hoặc tên tuổi bệnh nhân.
- Trộn dung dịch R1 vào R2, vortex đến khi tan hoàn toàn
- Hút 55 μ l dung dịch vào mỗi giếng thử đã đánh dấu trên khay thử
- Nhỏ vào mỗi giếng đánh dấu 2 giọt dầu paraffin
- Đậy nắp khay thử và lọ canh thang, ủ trong tủ ấm với nhiệt độ 37°C
- Đọc kết quả sau 48 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: không có sự đổi màu (màu vàng nhạt) Dương tính: có sự đổi màu (cam, đỏ cam hoặc đỏ, đỏ hồng)
- Nhận định kết quả kháng sinh đồ: chỉ đọc kết quả khi có dương tính với vi khuẩn *Mycoplasma hominis* (giếng 0 dương tính)
 - + Có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: R
 - + Với MH, có dương tính ở 1 trong 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: dương tính với nồng độ thấp và âm tính với nồng độ cao của tất cả kháng sinh trừ Clindamycin được hiểu là kháng (R), với Clindamycin được hiểu là nhạy (S)
 - + Giếng kháng sinh dương tính ở nồng độ cao và âm tính ở nồng độ thấp thì không phân giải và thực hiện lại xét nghiệm
 - + Không có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: (S)
- Nêu rõ kết quả thu được: có hay không có vi khuẩn *Mycoplasma hominis* mọc, nhạy/kháng với từng loại kháng sinh trong panel.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Các yếu tố có thể làm sai lệch kết quả xét nghiệm như do thời gian, nhiệt độ ủ thành test không đúng, hóa chất quá hạn sử dụng hoặc các dụng cụ lấy mẫu bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. CLSI M43, *Methods for antimicrobial susceptibility testing for Human Mycoplasma*, approved guideline- M43-A, 2015.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

452. *Ureaplasma urealyticum* kháng thuốc

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định tính kháng thuốc của vi khuẩn *Ureaplasma urealyticum* từ dịch sinh dục.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *Ureaplasma urealyticum* được xác định bằng phương pháp cấy trong canh thang đã có sẵn lượng kháng sinh nhất định. Đánh giá mức độ nhạy cảm với kháng sinh tùy theo khả năng mọc của vi khuẩn trong môi trường có chứa kháng sinh.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường Mycoplasma IST3
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0.9%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đèn cồn
- Tăm bông vô trùng
- Khẩu trang, găng tay y tế
- Giấy lau bề mặt
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy

- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần có chống đông.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 48-72 giờ (2 – 3 ngày).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Ghi thông tin mẫu bệnh phẩm ống dung dịch R1

- Với bệnh phẩm nước tiểu hoặc chất lỏng thể tích trên 200 μ l, lấy 200 μ l bệnh phẩm chuyển vào dung dịch R1.
- Với bệnh phẩm chất lỏng thể tích trên 100 μ l và dưới 200 μ l, trộn dung dịch R1 và R2 để thu được canh thang Urea-Arginine LYO 2, điều chỉnh để lấy tỷ lệ canh thang và bệnh phẩm bằng nhau.
- Với bệnh phẩm tăm bông lấy bệnh phẩm dịch niệu đạo/dịch cổ tử cung, ngâm vào dung dịch R1
- Lấy thanh thử ra để ở nhiệt độ phòng, ghi mã số bệnh phẩm hoặc tên tuổi bệnh nhân.
- Trộn dung dịch R1 vào R2, vortex đến khi tan hoàn toàn
- Hút 55 μ l dung dịch vào mỗi giếng thử đã đánh dấu trên khay thử
- Nhỏ vào mỗi giếng đánh dấu 2 giọt dầu paraffin
- Đậy nắp khay thử và lọ canh thang, ủ trong tủ ấm với nhiệt độ 37°C
- Đọc kết quả sau 48 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: không có sự đổi màu (màu vàng nhạt) Dương tính: có sự đổi màu (cam, đỏ cam hoặc đỏ, đỏ hồng)
- Nhận định sự có mặt của vi khuẩn ở giếng thử 0, Uspp
- Nhận định kết quả kháng sinh đồ: chỉ đọc kết quả khi có dương tính với vi khuẩn *Ureaplasma urealyticum* (giếng 0 dương tính)
 - + Có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: R
 - + Với *Ureaplasma urealyticum*, có sự đổi màu ở 1 trong 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: dương tính với nồng độ thấp và âm tính với nồng độ cao của tất cả kháng sinh trừ Tetracycline được hiểu là kháng (R), với Tetracycline được hiểu là nhạy (S)
 - + Giếng kháng sinh dương tính ở nồng độ cao và âm tính ở nồng độ thấp thì không phiên giải và thực hiện lại xét nghiệm
 - + Không có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: (S)
- Nêu rõ kết quả thu được: có hay không có vi khuẩn *Ureaplasma urealyticum* mọc, nhạy/kháng với từng loại kháng sinh trong panel.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Các yếu tố có thể làm sai lệch kết quả xét nghiệm như do thời gian, nhiệt độ ủ thanh test không đúng, hóa chất quá hạn sử dụng hoặc các dụng cụ lấy mẫu bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. CLSI M43, *Methods for antimicrobial susceptibility testing for Human Mycoplasma*, approved guideline- M43-A, 2015.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

453. *Mycoplasma hominis* & *Ureplasma spp.* nuôi cấy định danh, kháng sinh đồ

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Nuôi cấy, định danh và xác định tính kháng thuốc vi khuẩn *Mycoplasma hominis* & *Ureplasma spp.* bằng kit Mycoplasma IST3, đảm bảo kết quả xét nghiệm chính xác, tin cậy và kịp thời.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Vi khuẩn được định danh và xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa bằng phương pháp cấy trong canh thang đã có sẵn lượng kháng sinh nhất định. Đánh giá mức độ nhạy cảm với kháng sinh tùy theo khả năng mọc của vi khuẩn trong môi trường có chứa kháng sinh.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm
- Kỹ thuật y

2.2. Thiết bị y tế

- Môi trường Mycoplasma & Ureplasma IST3
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng 0.9%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử nhiễm
- Nội kiểm chất lượng
- Lọ môi trường bảo quản bệnh phẩm
- Que tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Đèn cồn
- Khẩu trang, găng tay y tế
- Giấy lau bề mặt
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ âm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: dịch âm đạo, dịch niệu đạo, nước tiểu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 48 - 96 giờ (2 - 4 ngày).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Lấy bệnh phẩm: theo quy trình phòng xét nghiệm.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo quy trình của phòng xét nghiệm.

- Ghi thông tin mẫu bệnh phẩm ống dung dịch R1
- Với bệnh phẩm nước tiểu hoặc chất lỏng thể tích trên 200 μ l, lấy 200 μ l bệnh phẩm chuyển vào dung dịch R1. Lấy 3ml dung dịch R1 đã cấy vào lọ R2
- Với bệnh phẩm chất lỏng thể tích trên 100 μ l và dưới 200 μ l, trộn dung dịch R1 và R2 kết hợp với mẫu để thu được canh thang Urea-Arginine LYO 2.
- Với bệnh phẩm tăm bông lấy bệnh phẩm dịch niệu đạo/dịch cổ tử cung, ngâm vào dung dịch R1
- Trộn dung dịch R1 vào R2, vortex đến khi tan hoàn toàn
- Lấy thanh thử ra để ở nhiệt độ phòng, ghi mã số bệnh phẩm hoặc tên tuổi bệnh nhân.
- Hút 55 μ l dung dịch vào mỗi giếng thử đã đánh dấu trên khay thử
- Nhỏ vào mỗi giếng đánh dấu 2 giọt dầu paraffin
- Đậy nắp khay thử và lọ canh thang, ủ trong tủ ấm với nhiệt độ 37°C
- Đọc kết quả sau 48 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: không có sự đổi màu (màu vàng nhạt)
- Dương tính: có sự đổi màu (cam, đỏ cam hoặc đỏ, đỏ hồng), canh thang thì không phiên giải
- Nhận định sự có mặt của vi khuẩn ở giếng thử 0, Mh, Uspp
 - + Canh thang Urea-Arginine LYO đục thì không phiên giải
 - + MH dương tính: có sự đổi màu ở giếng 0 và Mh
 - + Uspp dương tính: có sự đổi màu ở giếng 0 và Uspp
 - + Không phiên giải nếu âm tính ở giếng 0
 - + Không phiên giải nếu dương tính ở giếng 0 và các giếng khác dương tính ngẫu nhiên
- Nếu hiệu giá thấp chỉ có dương tính ở canh thang Urea-Arginine LYO mà không có ở giếng 0 thì phiên giải âm tính
- Với thử nghiệm kháng sinh đồ, đọc sau 48h.
 - + Nhận định kết quả kháng sinh đồ với *Ureaplasma urealyticum*: chỉ đọc kết quả khi có dương tính với vi khuẩn *Ureaplasma urealyticum* (giếng 0 dương tính)
 - + Nhận định kết quả kháng sinh đồ với *Mycoplasma hominis*: chỉ đọc kết quả khi có dương tính với vi khuẩn *Mycoplasma hominis* (giếng 0 dương tính)
 - + Có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: R

- + Với *Ureaplasma spp.*, kết quả kháng sinh đồ được phiên giải là kháng (R) nếu đổi màu ở giếng đỏ, trừ Tetracycline cần được phiên giải là nhạy cảm (S).
- + Với *Mycoplasma hominis*, kết quả kháng sinh đồ được phiên giải là kháng (R) nếu đổi màu ở giếng đỏ, trừ Clindamycin cần được phiên giải là nhạy cảm (S).
- + Giếng kháng sinh dương tính ở nồng độ cao và âm tính ở nồng độ thấp thì không phiên giải và thực hiện lại xét nghiệm.
- + Không có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh: (S) Theo hướng dẫn CLSI M43-A, vi khuẩn nhạy cảm với Tetracycline được phiên giải nhạy cảm với Doxycycline và vi khuẩn nhạy cảm với Erythromycin được phiên giải nhạy cảm với Azithromycin.
- Nếu rõ kết quả thu được: có hay không có vi khuẩn *Mycoplasma hominis* & *Ureaplasma spp.* mọc, nhạy/kháng với từng loại kháng sinh trong panel.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Các yếu tố có thể làm sai lệch kết quả xét nghiệm như do thời gian, nhiệt độ ủ thanh test không đúng, hóa chất quá hạn sử dụng hoặc các dụng cụ lấy mẫu bị nhiễm bẩn.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)

- Thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Đối với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. CLSI M43, *Methods for antimicrobial susceptibility testing for Human Mycoplasma*, approved guideline- M43-A, 2015.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

454. *Candida* Ag miễn dịch bán tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên của nấm *Candida* có trong mẫu bệnh phẩm của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzyme). Phức hợp KN-KT được phát hiện nhờ enzym gắn với KT tác động lên cơ chất đặc hiệu. Kết quả được đánh giá qua sự biến đổi màu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiệt trùng
- Ống Falcon 5-15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Cốc đong 500ml, 1000ml
- Bông tiêm
- Panh
- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy ELISA bán tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Cốc đong 500 ml; 1000 ml
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 240 phút (4 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị mẫu: xử lý chứng âm, chứng dương, chứng ngưỡng cùng lúc với mẫu bệnh phẩm.
5	Hút 300 μ L mẫu huyết thanh/ dịch hút phế quản vào từng ống polypropylene 1,5 mL
6	Thêm 100 μ L dung dịch xử lý mẫu vào mỗi ống, lắc trộn kỹ.
7	Đun nóng mẫu ở 120°C trong 6 phút bằng máy gia nhiệt, hoặc 100°C trong 3 phút bằng bể đun nước.
8	Ly tâm 10.000 x g trong 10 phút.
9	Thu dịch nổi để làm xét nghiệm phát hiện Vi nấm Ag.
10	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
11	Đặt số thanh vi giếng yêu cầu vào hộp đựng nhựa và cẩn thận xác định các giếng cho chất chứng và mẫu. Cho 100 μ l chất chứng và 100 μ l mẫu vào mỗi giếng đã định.
12	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
13	Rửa tay hoặc dùng rửa máy với dung dịch rửa đã pha 5 lần. Rửa xong, giữ sạch nước rửa còn sót.
14	Nhỏ 100 μ l chất liên hợp vào mỗi giếng.
15	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
16	Lặp lại bước rửa.
17	Thêm 100 μ l cơ chất vào mỗi giếng.
18	Ủ ở nhiệt độ và thời gian hướng dẫn của bộ sinh phẩm.
19	Nhỏ 100 μ l Stop.
20	Đọc kết quả ở bước sóng 450 nm (bước sóng tham chiếu 650 nm)

4.2. Nhận định kết quả

Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả:

Tính giá trị ngưỡng: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phiên giải và báo cáo kết quả: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất dựa trên giá trị ngưỡng:

- Kết quả $>$ giá trị ngưỡng: Dương tính
- Kết quả $<$ giá trị ngưỡng: Âm tính
- Kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì kết luận: Không xác định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

Xử trí: Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng..

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.

- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Ng nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
4. Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller. *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 13th edition.
5. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.

455. Xác định gen Virus cúm A bằng kỹ thuật RT-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Hướng dẫn thực hiện quy trình xét nghiệm phát hiện định tính, xác định thứ typ của virus cúm A có trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR. Bao gồm:

Phát hiện tác nhân virus: Influenza A virus, Influenza B virus, Human Respiratory Syncytial Virus A (RSV A), Human Respiratory Syncytial Virus B (RSV B), và thứ typ của virus cúm A (A/H1, A/H3, A/H1pdm09) trong bệnh phẩm dịch hút mũi họng, tăm bông ngoáy mũi họng và dịch rửa phế quản.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm dựa trên công nghệ MuDT™ (Công nghệ phát hiện đa đích) độc quyền của Seegene và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm gồm 2 giai đoạn:

- Tách chiết acid nucleic.
- Khuếch đại DNA mẫu sử dụng môi và mẫu dò đặc hiệu của vi sinh vật.

Công nghệ MuDT™ cho biết nhiều giá trị chu kỳ ngưỡng (threshold cycle) ở cùng một kênh màu mà không cần phân tích đường cong nóng chảy trên máy real-time PCR giúp rút ngắn thời gian thực hiện tương tự như một phản ứng Real-time PCR thông thường.

Mẫu chứng nội (IC) được thêm vào mẫu bệnh phẩm ngay từ bước tách chiết và được khuếch đại đồng thời cùng với acid nucleic đích giúp kiểm soát toàn bộ quá trình.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ vi sinh hoặc bác sĩ xét nghiệm hoặc kỹ thuật y.

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ kit chẩn đoán nhiễm khuẩn hô hấp 1 (chẩn đoán Cúm/RSV/thứ typ cúm A) (Ví dụ hoặc tương đương)
- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng

- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiết trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiết trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex

- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: dịch hút mũi họng, tăm bông ngoáy mũi họng và dịch rửa phế quản.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có).

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Khoảng 300 phút (5 giờ).

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

- Phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho 10 µl chứng nội PR-V IC vào mẫu trước khi tách chiết.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

5 uL	5X MOM (tương ứng với từng bộ kit)
5 uL	Rnase-free water (tương ứng với từng bộ kit)
5 uL	Real-time One-step Buffer (tương ứng với từng bộ kit)
2 uL	Real-time One-step Enzyme (tương ứng với từng bộ kit)
17 uL	Tổng thể tích Mastermix

- Hút 17 µl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 8 µl sản phẩm đã tách chiết, 8 µl chứng dương và 8 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 25 µl.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm đã tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Step	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	50°C	20 min
2		95°C	15 min
3	45	95°C	10 sec
4*		60°C	1 min
5*		72°C	10 sec
6	GOTO Step 3, 44 more times		

- Màu huỳnh quang: FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Xem xét kết quả nội kiểm (QC). Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

* Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.

* Phân tích kết quả trong Seegene Viewer

a. Mở chương trình Seegene Viewer, chọn Open để mở file đã được lưu trong “QuantStep4”.

b. Chọn loại kit xét nghiệm trong PRODUCT.

Lưu ý xác định loại ống khi chọn bộ kit xét nghiệm (dây 8 hoặc đĩa 96).

c. Kiểm tra kết quả ở mỗi vị trí.

- Kết quả dương khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) ≤ 42 .
- Kết quả âm khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) > 42 hoặc N/A.

Kênh màu	RP1	
	Đường 1	Đường 2
FAM	RSV A	Flu A
HEX	RSV B	Flu B
Cal Red 610	Flu A-H1pdm09	Flu A-H1
Quasar 670	IC	Flu A-H3

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Trả kết quả theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng hoặc bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm không đúng quy định. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Trong trường hợp không thể

lấy lại được bệnh phẩm, phòng xét nghiệm vẫn thực hiện và ghi chú về tính không chính xác của kết quả xét nghiệm do lấy mẫu không đảm bảo chất lượng.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, *Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm*, 2016.
 2. Bộ Y tế, *Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học*, 2017.
 3. Bộ Y tế, *Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm*, 2023.
 4. Amy L. Leber, CareyAnn D. Burnham. *Clinical microbiology procedures handbook*. ASM Press, Washington, DC. 2023, 5th edition.
-