

LỜI CẢM ƠN

Nhằm hỗ trợ cán bộ y tế dự phòng trong việc thực hiện công tác xét nghiệm bệnh truyền nhiễm, đảm bảo chất lượng xét nghiệm cũng như thực hành an toàn sinh học trong phòng xét nghiệm, đảm bảo tính thống nhất giữa các phòng xét nghiệm, năm 2017, Cục Y tế dự phòng đã ban hành Sổ tay xét nghiệm bệnh truyền nhiễm tập I để hướng dẫn xét nghiệm các bệnh Cúm, Rubella, Sốt xuất huyết Dengue, Sởi, Tay chân miệng, Zika, Sốt rét và Viêm màng não mô cầu trong. Sổ tay xét nghiệm bệnh truyền nhiễm tập I là tài liệu tham khảo hữu ích cho các cán bộ làm công tác xét nghiệm. Phát huy hiệu quả của Sổ tay xét nghiệm Bệnh truyền nhiễm tập I, Cục Y tế dự phòng đã phối hợp với Viện vệ sinh dịch tễ, Viện Pasteur, các bệnh viện tuyến trung ương, Tổ chức Y tế thế giới, Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh (Hoa Kỳ) CDC và Sổ tay xét nghiệm bệnh truyền nhiễm tập II năm 2018 hướng dẫn xét nghiệm bệnh Bại liệt, Bạch hầu, Viêm gan B, Viêm gan C, bệnh tiêu chảy cấp (do vi rút rota) và Thương hàn.

Sổ tay xét nghiệm bệnh truyền nhiễm tập II là tài liệu hướng dẫn chuyên môn cho các cán bộ và phòng xét nghiệm bệnh truyền nhiễm tại Việt Nam nắm rõ các yêu cầu cơ bản cũng như cụ thể về nhân sự, cơ sở vật chất, trang thiết bị, nguyên tắc và quy trình chi tiết thực hiện xét nghiệm, các yêu cầu về an toàn sinh học nhằm đảm bảo tránh lây nhiễm từ phòng xét nghiệm để phục vụ việc chẩn đoán tác nhân gây bệnh truyền nhiễm từ đó xây dựng và triển khai hoạt động xét nghiệm, từng bước nâng cao năng lực xác định các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, mới nổi, góp phần phòng chống dịch bệnh, bảo vệ sức khỏe người dân.

Cục Y tế dự phòng trân trọng cảm ơn những đóng góp quý báu của các chuyên gia từ các Viện Vệ sinh dịch tễ, Viện Pasteur, các bệnh viện tuyến Trung ương, Tổ chức Y tế thế giới, Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ (CDC), các thành viên của Ban biên soạn, tổ biên tập, Hội đồng chuyên môn nghiệm thu cuốn tài liệu Sổ tay xét nghiệm bệnh truyền nhiễm tập II và các nhà chuyên môn đã tham gia góp ý cho tài liệu này.

Trong quá trình biên tập, in ấn tài liệu khó có thể tránh được các sai sót, mong nhận được sự góp ý gửi về Cục Y tế dự phòng – Bộ Y tế, số 135 Núi Trúc – Ba Đình – Hà Nội.

Trân trọng cảm ơn.

CỤC Y TẾ DỰ PHÒNG

Chủ biên:

- Bà Nguyễn Minh Hằng, Phó Cục trưởng, Cục Y tế dự phòng

Ban biên soạn:

- Ông Nguyễn Vũ Trung, Phó Giám đốc, Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương;
- Ông Nguyễn Xuân Tùng, Trưởng phòng Quản lý tiêm chủng và an toàn sinh học – Cục Y tế dự phòng;
- Bà Hoàng Thị Bích Ngọc, Phó trưởng Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương;
- Bà Vũ Thị Tường Vân, Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Bạch Mai;
- Bà Nghiêm Mỹ Ngọc, Phó trưởng Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới TP. Hồ Chí Minh;
- Bà Vũ Thị Quế Hương, Khoa Vi sinh miễn dịch, Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh;
- Ông Nguyễn Bảo Triệu, Trưởng khoa vi rút, Viện Pasteur Nha Trang;
- Ông Lê Văn Tuấn, Phó Trưởng khoa Vi rút, Viện Vệ sinh dịch tễ Tây Nguyên;
- Bà Trần Thị Nguyên Hòa, Khoa Vi rút Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.
- Bà Hà Thị Cẩm Vân, Phòng Quản lý tiêm chủng và an toàn sinh học – Cục Y tế dự phòng;
- Bà Nguyễn Thị Mỹ Hạnh, Phòng Quản lý tiêm chủng và an toàn sinh học – Cục Y tế dự phòng;
- Ông Lê Mai Hùng, Phòng Quản lý tiêm chủng và an toàn sinh học – Cục Y tế dự phòng;
- Ông Lê Văn Sang, Phòng Quản lý tiêm chủng và an toàn sinh học – Cục Y tế dự phòng;

Tổ biên tập:

- Ông Trịnh Xuân Tùng, Phòng Quản lý tiêm chủng và an toàn sinh học – Cục Y tế dự phòng;
- Bà Đỗ Thị Thu, Phòng Quản lý tiêm chủng và an toàn sinh học – Cục Y tế dự phòng;
- Bà Đặng Phương Linh, Phòng Quản lý tiêm chủng và an toàn sinh học – Cục Y tế dự phòng;

MỤC LỤC

TỪ VIẾT TẮT	6
THUẬT NGỮ.....	9
BỆNH BẠI LIỆT (POLIOMYELITIS)	10
I. Mô tả chung	10
II. Yêu cầu chung.....	11
1. Nhân sự	11
2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị.....	11
3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm.....	12
4. Đọc và đánh giá kết quả.....	15
5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm	15
III. Phương pháp xét nghiệm	17
1. Phương pháp phân lập vi rút bại liệt trên dòng tế bào RD-A và L20B	17
2. Định loại týp huyết thanh vi rút bại liệt, phân biệt chủng hoang dại hay có liên quan đến vắc xin (ITD/VDPV) bằng phương pháp rRT-PCR.....	21
3. Xác định vi rút đường ruột bằng phương pháp trung hòa vi lượng...30	
4. Xác định týp huyết thanh của vi rút bại liệt bằng phương pháp trung hòa vi lượng	35
IV. Tài liệu tham khảo	38
BỆNH BẠCH HẦU (DIPHTHERIA).....	40
I. Mô tả chung	40
II. Yêu cầu chung.....	41
1. Nhân sự	41
2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị.....	41
3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm.....	42
4. Đọc và đánh giá kết quả.....	44
5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm	45
III. Phương pháp xét nghiệm	46
1. Phương pháp nuôi cấy định danh.....	47
2. Phương pháp sinh học phân tử.....	56
IV. Tài liệu tham khảo	61
BỆNH TIÊU CHẢY CẤP DO VI RÚT ROTA (ROTAVIRUS)	64
I. Mô tả chung	64
II. Yêu cầu chung.....	64
1. Nhân sự	64
2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị.....	64
3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm.....	65

4.	Đọc và đánh giá kết quả.....	68
5.	Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm	68
III.	Phương pháp xét nghiệm	71
1.	Phương pháp xét nghiệm nhanh	71
2.	Phương pháp xét nghiệm ELISA	74
3.	Phương pháp xét nghiệm RT-PCR	78
IV.	Tài liệu tham khảo	83
	BỆNH THUỖNG HÀN (TYPHOID FEVER).....	85
I.	Mô tả chung	85
II.	Yêu cầu chung:	86
1.	Nhân sự	86
2.	Cơ sở vật chất, trang thiết bị	86
3.	Đảm bảo chất lượng xét nghiệm	87
4.	Đọc và đánh giá kết quả.....	89
5.	Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm	90
III.	Phương pháp xét nghiệm	91
1.	Phương pháp nuôi cấy vi sinh.....	91
2.	Phương pháp xét nghiệm PCR.....	97
3.	Phương pháp xét nghiệm nhanh chẩn đoán huyết thanh học bệnh thuởng hàn.....	101
IV.	Tài liệu tham khảo	105
	BỆNH VIÊM GAN B (HEPATITIS B).....	107
I.	Mô tả chung	107
II.	Yêu cầu chung.....	107
1.	Nhân sự	107
2.	Cơ sở vật chất, trang thiết bị	108
3.	Đảm bảo chất lượng xét nghiệm	108
4.	Đọc và đánh giá kết quả.....	111
5.	Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm	111
III.	Phương pháp xét nghiệm	114
1.	Xác định kháng nguyên HBsAg bằng test nhanh	114
2.	Xác định HBsAg miễn dịch gắn enzyme (ELISA).....	116
3.	Xác định HBsAg miễn dịch tự động bằng phương pháp CMIA	118
4.	Xác định Anti-HBs bằng phương pháp CMIA	121
5.	Xác định HBsAg miễn dịch tự động bằng phương pháp ECLIA....	123
6.	Xác định Anti-HBs bằng phương pháp ECLIA.....	126
IV.	Tài liệu tham khảo	127
	BỆNH VIÊM GAN C (HEPATITIS C)	129
I.	Mô tả chung	129

II.	Yêu cầu chung.....	129
1.	Nhân sự	129
2.	Cơ sở vật chất, trang thiết bị.....	130
3.	Đảm bảo chất lượng xét nghiệm.....	130
4.	Đọc và đánh giá kết quả.....	132
5.	Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm ...	133
III.	Phương pháp xét nghiệm	135
1.	Xác định kháng thể HCV bằng phương pháp xét nghiệm sắc ký miễn dịch (SD BIOLINE HCV)	135
2.	Xác định kháng thể HCV bằng phương pháp xét nghiệm ELISA (Murex HVC 4.0).....	137
3.	Xác định kháng thể HCV bằng phương pháp xét nghiệm ECLIA ..	139
4.	Xác định HCV Core Ag bằng phương pháp xét nghiệm CMIA	141
IV.	Tài liệu tham khảo	142

TỪ VIẾT TẮT

ADN	Acid deoxyribonucleic
μg	Microgram
μl	Microlit
μM	Micromol/lít
Anti-HCV	Kháng thể vi rút viêm gan C
Anti-HBc	Kháng thể kháng kháng nguyên lõi
Anti-Hbe	Kháng thể kháng kháng nguyên vỏ
Anti-HBs	Kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt
RNA	Ribonucleic acid
ATSH	An toàn sinh học
BA	Thạch máu (Blood Agar)
BHI	Canh thang (Brain Heart Infusion Agar)
Bp	Cặp Base pairs
CCID ₅₀ /TCID ₅₀	Liều hủy hoại 50% tế bào (Cell/Tissue Culture Infective Dose)
CDC	Trung tâm dự phòng và kiểm soát bệnh tật Hoa Kỳ
COI	Chỉ số ngưỡng (cut-off index)
CPE	Sự hủy hoại tế bào (CytoPathic Effects)
Ct	Ngưỡng chu kỳ thấp nhất tại đây mẫu bắt đầu có tín hiệu huỳnh quang vượt giá trị nền và được xác định dương tính (Cycle of threshold)
CMIA	Xét nghiệm miễn dịch vi hạt hóa phát quang (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay)
DNA	Deoxyribonucleotide acid
dNTP	Deroxyribonucleic triphosphate
ECLIA	Kỹ thuật điện hóa phát quang (Electro-chemiluminescence immunoassay)
ELISA	Kỹ thuật miễn dịch gắn enzyme (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
HCV	Vi rút viêm gan C (Hepatitis C virus)
HEK	Thạch Hektoen
HBcAg	Kháng nguyên lõi của vi rút viêm gan B (Hepatitis B core Antigen)
HBeAg	Kháng nguyên vỏ của vi rút viêm gan B (Hepatitis B envelope Antigen)
HBsAg	Kháng nguyên bề mặt của vi rút viêm gan B (Hepatitis B surface Antigen)
HBV	Vi rút viêm gan B (Hepatitis B virus)

IPV	Vắc xin bại liệt bất hoạt (Inactivated Poliovirus Vaccine)
ITD	Sự định loại dưới phân típ của vi rút bại liệt típ 1, 2 và 3, phân biệt vi rút hoang dại hoặc vi rút có nguồn gốc vắc xin (IntraTypic Differentiation)
KIA	Môi trường thạch Kligler
KHT	Kháng huyết thanh
L20B	Tế bào lympo chuột gấn thụ thể đặc hiệu cho vi rút bại liệt
LDC	Lysin decarboxylase
MC	Thạch MacConkey
MEM	Môi trường dinh dưỡng tối thiểu (Minimum Essential Medium)
MR	Methyl red
NEC	Chứng âm tách chiết (Negative Extraction Control)
NPEV	Vi rút đường ruột không phải bại liệt (Non-Polio Enterovirus)
NTC	Chứng âm phản ứng (No Template Control)
ODC	Ornithin decarboxylase
OPV	Vắc xin bại liệt sống giảm động lực (Oral Poliovirus Vaccine)
PCR	Phản ứng khuếch đại chuỗi (Polymerase Chain Reaction)
Primer	Mồi
Probe	Đầu dò
PV	Vi rút bại liệt (Polio virus)
PXN	Phòng xét nghiệm
RD-A	Tế bào ung thư (Human Rhabdomyosarcoma) gấn thụ thể đặc hiệu cho các vi rút đường ruột
RLU	Đơn vị ánh sáng tương đối (Relative Light Unit)
rRT-PCR	Phản ứng phiên mã ngược khuếch đại chuỗi, thời gian thực (real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)
RT-PCR	Phản ứng phiên mã ngược khuếch đại chuỗi (Reverse transcription polymerase chain reaction)
SD	Độ lệch chuẩn (Standard Deviation)
Serotype	Týp huyết thanh
SS	Thạch Salmonella Shigella
TAE	Dung dịch đệm TAE (Tris/ Acetate/EDTA)
VDPV	Vi rút bại liệt có nguồn gốc vắc xin
VP	Voges Proskauer
VRDR	Vi rút đường ruột

WHO

Tổ chức Y tế thế giới (World Health Organization)

THUẬT NGỮ

Mẫu bệnh phẩm (sample)	Bao gồm các mẫu máu, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, phân, dịch tiết cơ thể người và các mẫu bệnh phẩm khác từ người có chứa chất lây nhiễm, các chủng vi sinh vật gây bệnh cho người
Độ chính xác (accuracy)	Là mức độ thống nhất của một giá trị đo so với giá trị thực của nó. Độ chính xác xác định bằng cách so sánh với mẫu chuẩn.
Độ đặc hiệu (specificity)	Là tỷ lệ giữa các kết quả thật sự âm tính trong tổng số kết quả âm tính của thử nghiệm.
Độ chụm (precision)	Mức độ phù hợp của các kết quả xét nghiệm riêng lẻ trong một lần thử nghiệm và giữa các lần thử nghiệm.
Độ nhạy (sensitivity)	Là tỷ lệ giữa các kết quả thật sự dương tính trong tổng số kết quả dương tính của thử nghiệm.
Chứng dương cao	Có nồng độ cao hơn nồng độ phát hiện thấp nhất (ngưỡng trên giới hạn phát hiện) trên 1 lần $\log_{10}$.
Chứng dương thấp	Có nồng độ cao hơn nồng độ phát hiện thấp nhất (ngưỡng trên giới hạn phát hiện) trong khoảng 1 lần $\log_{10}$.
Chứng âm	Mẫu âm tính.
Chủng chuẩn	Là chủng có nguồn gốc rõ ràng từ các bộ chủng được sưu tập trên thế giới.

BỆNH BẠI LIỆT (POLIOMYELITIS)

Bệnh truyền nhiễm thuộc nhóm A trong Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm

I. Mô tả chung

Bệnh bại liệt (*Poliomyelitis*) là bệnh nhiễm vi rút cấp tính, có thể lan truyền thành dịch do serotype (týp huyết thanh) 1, 2 và 3 của vi rút bại liệt gây nên. Vi rút sau khi xâm nhập vào cơ thể sẽ nhân lên tại hầu họng và đường ruột, xâm nhập vào đường máu, vào hệ thống thần kinh trung ương, gây tổn thương tế bào thần kinh vận động, dẫn đến liệt chi không đối xứng ở bệnh nhân, bệnh nhân có thể suy hô hấp và tử vong.

Bệnh bại liệt được ghi nhận là bệnh dịch tại Mỹ vào đầu thế kỷ 20, sau đây lan truyền nhanh chóng trên khắp toàn cầu vào những năm 1950. Chiến dịch thanh toán bệnh bại liệt đã ngăn chặn được sự lan truyền của vi rút bại liệt hoang dại, vi rút bại liệt hoang dại hiện chỉ còn gây các vụ dịch địa phương tại Afghanistan và Pakistan. Tuy nhiên các vụ dịch liên quan đến vi rút bại liệt có nguồn gốc vắc xin (VDPV) tại các vùng còn sử dụng vắc xin sống giảm động lực OPV vẫn được báo cáo hàng năm. Năm 1962, Việt Nam sản xuất thành công và từ năm 1981, vắc xin OPV được đưa vào chương trình tiêm chủng mở rộng thì tỷ lệ mắc đã giảm đáng kể và không có các vụ dịch xảy ra. Tuy nhiên, khi số ca bại liệt do nhiễm vi rút hoang dại vẫn còn duy trì, nguy cơ xảy ra dịch bệnh bại liệt do vi rút bại liệt hoang dại xâm nhập hay do sự bùng phát của các VDPV tại Việt Nam rất cao.

Chẩn đoán phòng xét nghiệm đóng vai trò quan trọng trong các hoạt động thanh toán bệnh bại liệt. Đặc biệt ở những nước không còn sự lan truyền gây bệnh của vi rút bại liệt hoang dại như Việt Nam, phòng xét nghiệm (PXN) có chức năng cung cấp thông tin kịp thời và chính xác về sự xâm nhập của vi rút bại liệt hoang dại để có phương hướng ngăn chặn sự lan truyền và cung cấp bằng chứng về mặt vi rút học cho chứng nhận thanh toán bại liệt. Vi rút bại liệt được phân lập từ mẫu phân trên dòng tế bào đặc hiệu. Mẫu phân lập dương tính được xác định vi rút bại liệt bằng phương pháp trung hòa vi lượng. Tất cả các chủng vi rút bại liệt cần phải được định loại phân biệt vi rút là chủng hoang dại hay có liên quan đến vắc xin bằng phương pháp rRT-PCR_ITD/VDPV hoặc phương pháp RT-PCR/sequencing gene VP1. Nhằm thay thế phương pháp phân lập cổ điển, tuy là phương pháp chuẩn vàng nhưng tốn kém về thời gian và nhân lực, các phương pháp sinh học phân tử (RT-PCR) phát hiện vi rút bại liệt trực tiếp từ mẫu phân tách chiết đang được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) hướng tới để áp dụng trong tương lai gần (Hình 1). Phương pháp huyết thanh học, kiểm tra kháng thể trung hòa vi rút bại liệt thường không được khuyến khích sử dụng thường xuyên trong chẩn đoán bại liệt vì yêu cầu cao về cơ sở vật chất và tốn thời gian nhưng lại khó phân tích kết quả,

và phương pháp không phân biệt được giữa kháng thể chống vi rút hoang dại hay chủng vắc xin .

Phương pháp xét nghiệm vi rút bại liệt trong nội dung hướng dẫn này được WHO khuyến cáo sử dụng bao gồm: (1) Phương pháp nuôi cấy vi rút đường ruột và vi rút bại liệt trên dòng tế bào RD-A và L20B; (2) Xác định vi rút đường ruột bằng phương pháp trung hòa vi lượng; (3) Xác định týp huyết thanh của vi rút bại liệt bằng phương pháp trung hòa vi lượng; (4) Định loại các týp huyết thanh của vi rút bại liệt, phân biệt vi rút là chủng hoang dại hay có liên quan đến vắc xin (ITD/VDPV) bằng phương pháp rRT-PCR.

II. Yêu cầu chung

1. Nhân sự

- Có ít nhất 02 cán bộ có chuyên môn phù hợp và đã được đào tạo về các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán bệnh bại liệt.

- Các cán bộ cần được đào tạo về cách sử dụng trang thiết bị, thực hành an toàn sinh học (ATSH), thực hành vi sinh chuẩn, và đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Các cán bộ PXN được đào tạo sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

- Nhân viên mới sau khi đánh giá có kết quả đạt, cần tiếp tục được giám sát ít nhất 3-6 tháng trước khi chính thức được thực hiện xét nghiệm độc lập.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả xét nghiệm là cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học, có kinh nghiệm công tác trong lĩnh vực xét nghiệm từ 3 năm trở lên.

- Cán bộ PXN được kiểm tra sức khỏe định kỳ tối thiểu 1 lần hàng năm và được uống hoặc tiêm vắc xin phòng bệnh bại liệt.

2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị

2.1. Cơ sở vật chất

- PXN cần đáp ứng về điều kiện an toàn sinh học (ATSH), hệ thống quản lý chất lượng PXN theo quy định hiện hành. Các kỹ thuật liên quan đến xử lý bệnh phẩm, nuôi cấy vi rút cần phải thực hiện tại PXN ATSH cấp II trở lên.

- Đối với xét nghiệm PCR cần các khu vực riêng: khu vực pha dung dịch phản ứng (1), khu vực tách chiết DNA (2), khu vực đặt máy rRT-PCR (3). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) → (2) → (3).

2.2. Trang thiết bị

Bảng 1. Trang thiết bị

Tên thiết bị	Phân lập vi rút	Realtime RT-PCR	Trung hòa vi lượng
Tủ ấm	2 cái		1 cái
Kính hiển vi lộn ngược	2 cái		1 cái
Tủ lạnh 2°C-8°C	1 cái	1 cái	1 cái
tủ âm -20°C hoặc thấp hơn, tủ âm -70°C hoặc thấp hơn	1 cái	1 cái	1 cái
Máy vortex	2 cái	1 cái	1 cái
Máy ly tâm thường		1 cái	1 cái
Pi pét một kênh (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	1 bộ	1 bộ	1 bộ
Pi pét đa kênh (8 hoặc 12 kênh) loại 25 µl - 300 µl	1 cái	1 cái	1 cái
Cốc đong 50 - 1000 ml	1 bộ	1 bộ	
Tủ ATSH phù hợp	2 cái	1 cái	2 cái
Máy realtime PCR	1 cái	1 cái	
Máy ly tâm lạnh	1 cái	1 cái	
Giá tích lạnh	1 cái	2 cái	
Cân phân tích	1 cái	1 cái	

- Hồ sơ thiết bị gồm: hồ sơ lắp đặt thiết bị, lý lịch thiết bị, hướng dẫn sử dụng, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Hồ sơ đào tạo sử dụng trang thiết bị cho các nhân viên vận hành thiết bị.

3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm

3.1. Trước xét nghiệm

3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu

- Loại mẫu: mẫu phân (Khoảng 2 gram phân)

- Điều kiện bảo quản:

+ Bảo quản mẫu ở nhiệt độ 2°C - 8°C và chuyển mẫu về PXN trong vòng 72 giờ kể từ ngày lấy mẫu. Nếu không gửi được ngay mẫu về PXN thì bảo quản ở nhiệt độ - 20°C và chuyển mẫu đến PXN trong điều kiện còn đông băng trong vòng 1 tháng.

+ Mẫu bệnh phẩm sau khi được chuyển về PXN sẽ được bảo quản ở 2°C-8°C trong vòng 48 giờ, -20°C trong vòng 1 năm, và -70°C trong thời gian lâu hơn.

+ Việc bảo quản trong quá trình vận chuyển theo quy định và theo hướng dẫn hiện hành.

- Tiêu chuẩn chấp nhận: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, đủ lượng mẫu, kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hoặc phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Tiêu chuẩn từ chối:

+ Bị bất hoạt do nhiệt, bị trộn lẫn, bị tán huyết mạnh, bị nhiễm khuẩn.

+ Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.2 về hủy mẫu tại hướng dẫn này.

3.1.2. **Hiệu chuẩn, hiệu chỉnh máy móc/trang thiết bị**

Tất cả các trang thiết bị cần thực hiện việc hiệu chuẩn, hiệu chỉnh, bảo dưỡng theo quy định.

3.1.3. **Kiểm tra chất lượng hóa chất sinh phẩm và vật tư tiêu hao**

- Hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định và còn hạn sử dụng.

- Có hồ sơ theo dõi sử dụng sinh phẩm, hóa chất vật tư tiêu hao.

- Cần có hồ sơ đánh giá, kiểm soát chất lượng sinh phẩm, hóa chất.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

+ Các loạt sinh phẩm khi nhận về đều phải được kiểm tra.

+ Quan sát bằng mắt thường xem các lọ hoá chất, sinh phẩm có bất thường không, ví dụ như bột nắp, rò rỉ, vẩn đục, thay đổi màu sắc.

+ Kiểm tra mỗi lô sinh phẩm theo bộ mẫu gồm 2 mẫu dương và 1 mẫu âm của tác nhân mà PXN đang thực hiện theo quy trình xét nghiệm.

+ Pha chế sinh phẩm phải luôn được đặt trong khay giữ lạnh và cất lại ngay sau khi dùng xong.

+ Vật tư hóa chất được quản lý theo đúng theo quy định và đảm bảo sự sẵn có cho việc thực hiện xét nghiệm.

3.2. **Trong xét nghiệm**

3.2.1. **Nội kiểm**

Đối với phân lập vi rút: Luôn cần tế bào chứng âm, là tuýp chỉ có môi trường nuôi cấy và lớp tế bào RD-A hoặc L20B, lớp tế bào là lớp tế bào nguyên vẹn sau 5 ngày được gây nhiễm với dung dịch 20% của mẫu bệnh phẩm phân. Mỗi mẫu bệnh phẩm được thực hiện trên hai dòng tế bào riêng biệt và mỗi dòng tế bào phải cấy trên 2 ống.

Đối với phản ứng trung hòa vi lượng: Mỗi xét nghiệm có tế bào chứng chỉ có môi trường MEM 2% và tế bào RD hoặc L20B và chứng vi rút chỉ có vi rút với độ pha loãng xác định và tế bào RD-A hoặc L20B, không có sự hiện diện của kháng huyết thanh.

Lớp tế bào chứng là lớp tế bào nguyên vẹn trong thời gian xét nghiệm. Lớp tế bào của chứng vi rút phải có hiện tượng hủy hoại tế bào trên 50%.

Kết quả chuẩn độ lại phải chứng minh hiệu giá vi rút trong phản ứng trung hòa đảm bảo đủ 30 – 300 TCID₅₀. Nếu hiệu giá vi rút trong phản ứng không nằm trong khoảng phù hợp, nên lặp lại xét nghiệm với nồng độ pha loãng thấp hoặc cao hơn, đảm bảo lượng vi rút phù hợp cho phản ứng.

Đối với kỹ thuật rRT-PCR: Luôn sử dụng mẫu chứng trong mỗi lần xét nghiệm, trong đó:

- Chứng âm:

- +Chứng âm phản ứng (NTC): là nước khử ion được cung cấp cùng bộ sinh phẩm, chứng âm phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR.

- +Chứng âm tách chiết (NEC) (nếu có): mẫu tách chiết là môi trường vận chuyển và được tách chiết cùng mẫu bệnh phẩm; phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR.

- Chứng dương: RNA của các chủng chuẩn vi rút bại liệt, được cung cấp bởi WHO.

3.2.2. **Đánh giá từ bên ngoài**

Tham gia đánh giá từ bên ngoài (ngoại kiểm, liên phòng hoặc PXN tham chiếu) và thực hiện hành động khắc phục khi kết quả không đạt.

3.3. **Sau xét nghiệm**

3.3.1. **Bảo quản và lưu trữ mẫu bệnh phẩm**

- Trong trường hợp cần thiết, mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được lưu trong tủ lạnh (từ -20°C hoặc thấp hơn).

- Sau khi cất mẫu, nhân viên PXN ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào sổ lưu giữ mẫu.

- Tất cả các mẫu bệnh phẩm được xếp theo thứ tự từng năm và có sổ lưu giữ mẫu và sơ đồ tủ lưu giữ.

- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

3.3.2. **Tiêu hủy mẫu bệnh phẩm**

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:

- +Mẫu bệnh phẩm bị từ chối (không đạt tiêu chuẩn).

- +Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ.

- Cho bệnh phẩm cần hủy vào túi rác thải y tế, buộc miệng túi. Sử dụng túi nhựa hấp được, không bị rò rỉ, có quy định màu sắc, ký hiệu rõ ràng trên túi để đựng mẫu

- Hấp ướt tại 121°C trong 30 phút.
- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.
- Sau khi hoàn tất, kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt, các thông số trên máy đạt và lấy túi rác thải.
- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.
- Lập biên bản hủy mẫu theo quy định đảm bảo ATSH.

Lưu ý: Lò hấp phải được thẩm định định kỳ bằng chỉ thị sinh học và/hoặc chỉ thị hóa học cấp độ phù hợp.

4. Đọc và đánh giá kết quả

- Kết quả cần được kiểm giám sát và đánh giá bởi ít nhất 2 người và phải được lưu dưới dạng văn bản và trong máy tính.
- Phải kiểm tra các kết quả của mẫu chứng thỏa mãn điều kiện (tùy theo phương pháp áp dụng) mới tiến hành đánh giá kết quả trên mẫu bệnh phẩm xét nghiệm.
- Nếu chứng không đạt thì không được đánh giá kết quả xét nghiệm của mẫu bệnh phẩm mà phải thực hiện lại xét nghiệm; cần tiến hành kiểm tra lại quá trình xét nghiệm bắt đầu từ khâu chuẩn bị, tình trạng của mẫu chứng để tìm hiểu rõ nguyên nhân cần khắc phục.
- Có quy định cụ thể cho trả kết quả cho các trường hợp thường quy, kết quả bất thường/ báo động, khẩn, tạm thời và quy trình xử lý khi trả kết quả nhầm, chậm.

5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm

5.1. Lập kế hoạch bố trí thử nghiệm

- Kế hoạch bao gồm: Người chuẩn bị mẫu, người thực hiện, người đánh giá kết quả; tiêu chuẩn đánh giá; thời gian chuẩn bị mẫu; cách thức chuẩn bị mẫu; các bước tiến hành xét nghiệm, báo cáo kết quả; phê duyệt kết quả xét nghiệm.
- Cần xác định từng phương pháp định tính/định lượng hoặc bán định lượng để xác định giá trị sử dụng cho từng phương pháp,
- Đối với xét nghiệm định tính thì làm độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng.
- Đối với mỗi phương pháp xét nghiệm khi bắt đầu được áp dụng tại PXN mà không có bất kỳ sự thay đổi nào về phương pháp và loại mẫu sẽ tiến hành xác định 03 chỉ tiêu kỹ thuật cơ bản: độ chính xác (accuracy), độ đặc hiệu (specificity), độ chụm (precision). Yêu cầu mỗi đợt thẩm định được lặp lại ít nhất 3 lần để tính độ chụm.
- Cỡ mẫu cần phải được tính toán cẩn thận để nghiên cứu thẩm định có độ tin cậy cao và có ý nghĩa thống kê. Chuẩn: tối thiểu 10 chủng; Mẫu thực tế: tối thiểu 20 mẫu.

5.2. Độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu

- Bố trí thực hiện bộ mẫu đã được xác định kết quả bằng quy trình tiêu chuẩn hoặc kiểm tra lại kết quả bằng chương trình so sánh liên phòng.
- Thực hiện xét nghiệm như đối với các mẫu của bệnh nhân

Bảng 2. Đọc đánh giá xét nghiệm

Kết quả tại PXN	Kết quả của quy trình tiêu chuẩn	
	Dương tính	Âm tính
Dương tính	a	b
Âm tính	c	d

- Tính toán số liệu:

+Độ chính xác (Accuracy) = $(a+d)/N$

+Độ đặc hiệu (Specificity) = $d/(c+d)$

+Độ nhạy (Sensitivity) = $a/(a+b)$

+Giá trị tiên đoán dương tính (Positive Predictable Value) = $a/(a+c)$

+Giá trị tiên đoán âm tính (Negative Predictable Value) = $d/(b+d)$

Trong đó: $N = a + b + c + d$ tổng số kết quả xét nghiệm

Phương pháp nuôi cấy, phân lập, RT-PCR, trung hòa: Trong khuôn khổ hướng dẫn của WHO đối với việc thực hiện xét nghiệm bệnh bại liệt cần tối thiểu 10 mẫu âm tính và 10 mẫu dương cho việc xác nhận giá trị của phương pháp xét nghiệm.

5.3.Đánh giá kết quả:

Dựa vào việc so sánh các kết quả thực hiện so với tiêu chuẩn của quy trình tiêu chuẩn hoặc tiêu chuẩn nội bộ đề ra. Việc xác nhận giá trị sử dụng phương pháp được kết luận là đạt khi:

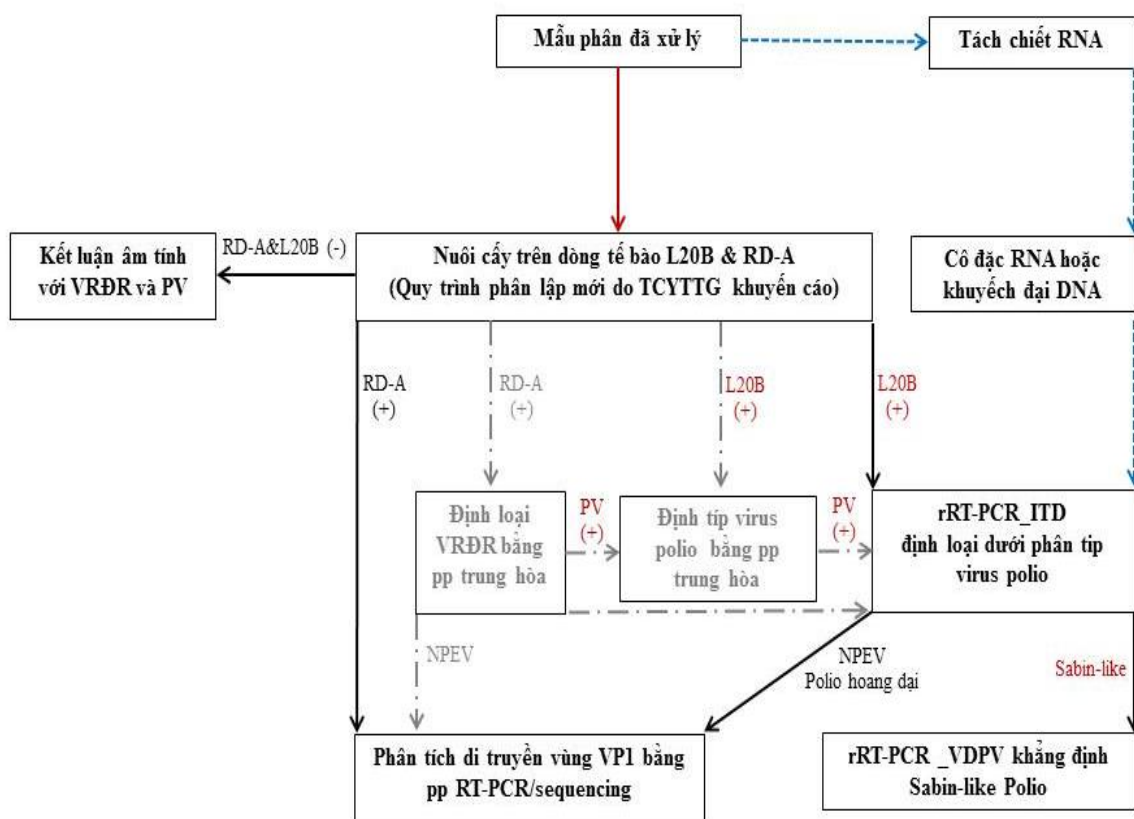
- Độ chính xác, độ đặc hiệu, độ nhạy lớn hơn hoặc bằng giá trị của quy trình tiêu chuẩn.
- Tỷ lệ dương tính giả, âm tính giả nhỏ hơn hoặc bằng giá trị của quy trình tiêu chuẩn. Kết quả đánh giá tính chính xác khi hệ số biến thiên $CV \leq$ hai lần chỉ số công bố của nhà sản xuất.
- Độ chính xác $\geq 90\%$;
- Độ đặc hiệu $\geq 90\%$;
- Độ nhạy $\geq 90\%$;
- Tỷ lệ dương tính giả $\leq 10\%$;
- Tỷ lệ âm tính giả $\leq 10\%$;

5.4.Xem xét định kỳ phương pháp xét nghiệm

- Cần xem xét tính hiệu quả của phương pháp xét nghiệm định kỳ hàng năm thông qua các tiêu chí kỹ thuật: Chính xác, Độ chụm. Nếu có yêu cầu thêm về tiêu chí kỹ thuật khác thì phải ghi rõ vào bản báo cáo kết quả. Nếu không có yêu cầu đặt biệt, 2 tiêu chí kỹ thuật trên có thể bố trí giống như thẩm định phương pháp ban đầu.

- Lưu hồ sơ tất cả các bước thực hiện trên bao gồm các bảng tổng hợp kết quả.

III. Phương pháp xét nghiệm



Hình 1. Sơ đồ xét nghiệm vi rút bại liệt

Ghi chú: - - - > Phương pháp xét nghiệm cổ điển; —> Phương pháp xét nghiệm hiện đang sử dụng rộng rãi trong mạng lưới các PXN của WHO;

- - - -> Phương pháp đang được nghiên cứu và áp dụng trong tương lai. (8)

1. Phương pháp phân lập vi rút bại liệt trên dòng tế bào RD-A và L20B

1.1. Phạm vi áp dụng

Quy trình áp dụng cho phân lập vi rút đường ruột trên 2 dòng tế bào RD-A và L20B từ mẫu lâm sàng là mẫu phân theo thường quy của WHO.

1.2. Nguyên lý

Vi rút bại liệt khi phát triển trên các dòng tế bào L20B, là dòng tế bào có gắn thụ thể đặc hiệu với vi rút bại liệt, và RD-A, là dòng tế bào có độ nhạy cao với các vi rút đường ruột chung, sẽ gây nên hiện tượng hủy hoại tế bào, có thể quan sát được dưới kính hiển vi lộn ngược.

1.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

1.4. Thực hiện xét nghiệm

1.4.1. Mẫu bệnh phẩm

Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm: Dịch nổi 20% mẫu phân đã xử lý theo thường quy của WHO như sau:

- Đánh dấu tuýp ly tâm 50 ml theo số hiệu mẫu bệnh phẩm
- Cho vào mỗi tuýp: 1 vài hạt bi thủy tinh, 10 ml PBS (+), + 2g phân, + 1ml chloroform được hỗn dịch phân 20% có 10% chloroform. Bịt kín đầu nắp mỗi tuýp bằng giấy parafin.
- Lắc mạnh bằng máy lắc trong 20 phút.
- Quay ly tâm tại tốc độ 1500g trong 20 phút ở 4°C.
- Chắt lấy nước nổi và chia ra 2 tuýp eppendorf loại 2 ml, đóng nắp. 1 tuýp giữ tại -20°C, 1 tuýp cất ở 4°C dùng cho phân lập vi rút.

Lưu ý:

- Bệnh phẩm đã xử lý sẽ được lưu giữ ở điều kiện -20°C.
- Yêu cầu dung dịch bệnh phẩm sau khi xử lý không quá đặc sệt hay có nhiều cặn mà phải có độ trong nhất định.
- Nếu phân trong tuýp đựng bệnh phẩm quá đặc và dính kết hoặc lượng mẫu không nhiều thì có thể đổ dung dịch PBS(+) đã đông ở tuýp ly tâm vào tuýp đựng bệnh phẩm rồi dùng vortex lắc để thu được lượng phân cần thiết đổ lại vào tuýp ly tâm để xử lý.
- Cần vặn chặt nắp của các tuýp ly tâm tránh dung dịch chứa bệnh phẩm cần xử lý bị rớt ra ngoài khi lắc hoặc ly tâm.

1.4.2. Sinh phẩm, hóa chất và vật tư tiêu hao

- Dung dịch PBS (+) có kháng sinh.
- Chloroform.
- Môi trường MEM có bổ sung huyết thanh bê bào thai (FBS) 10% (môi trường phát triển tế bào) và 2% (môi trường duy trì nuôi cấy vi rút).

Bảng 3. Thành phần môi trường phát triển và duy trì (sử dụng trong điều kiện nuôi cấy có CO₂)

Thành phần	Môi trường phát triển	Môi trường duy trì
Môi trường dinh dưỡng tối thiểu	83.3 ml	90.3 ml
L-Glutamine 200 nM	1.0 ml	1.0 ml
Huyết thanh bê bào thai (FBS)	10.0 ml	2.0 ml
NaHCO ₃ 7.5%	3.5 ml	4.5 ml

Thành phần	Môi trường phát triển	Môi trường duy trì
Hepes 1M	1.0 ml	1.0 ml
Penicillin/Streptomycin	1.0 ml	1.0 ml
0.4% đỏ phenol	0.2 ml	0.2 ml

- Các tuýp nuôi cấy tế bào RD-A hoặc L20B đã mọc tốt thành một lớp mỏng.
 + Kiểm tra các tuýp tế bào dưới kính hiển vi lộn ngược, khi tế bào mọc thành một lớp mỏng tối thiểu là 75%, thay môi trường phát triển bằng môi trường duy trì, mỗi tuýp tế bào 1 ml môi trường duy trì.

+ Ghi tên nhãn mẫu lên các tuýp nuôi cấy trên 2 dòng tế bào RD-A và L20B, mỗi dòng tế bào 2 tuýp. Cách ghi tên mẫu: tên mẫu (S1 hoặc S2), ngày cấy, số lần cấy truyền.

+ Đánh dấu 1 tuýp tế bào đối chứng với mỗi loại tế bào làm chứng tế bào.

- Pi pét Aid.

- Đầu côn vô trùng có lọc 1000 μ l.

- Pi pét 1000 μ l.

- Pi pét nhựa 5 ml hoặc 10 ml.

- Ống đựng môi trường vô trùng.

- Găng tay dùng 1 lần.

- Bút viết.

1.4.3. Các bước tiến hành

Bước 1: Dùng pi pét cấy 200 μ l mẫu bệnh phẩm vào mỗi tuýp, ủ 36°C trong tủ ẩm CO₂, các tuýp được cố định ở độ nghiêng 5°.

Bước 2: Quan sát hiện tượng hủy hoại tế bào (CPE) trên các tuýp nuôi cấy hàng ngày dưới kính hiển vi lộn ngược.

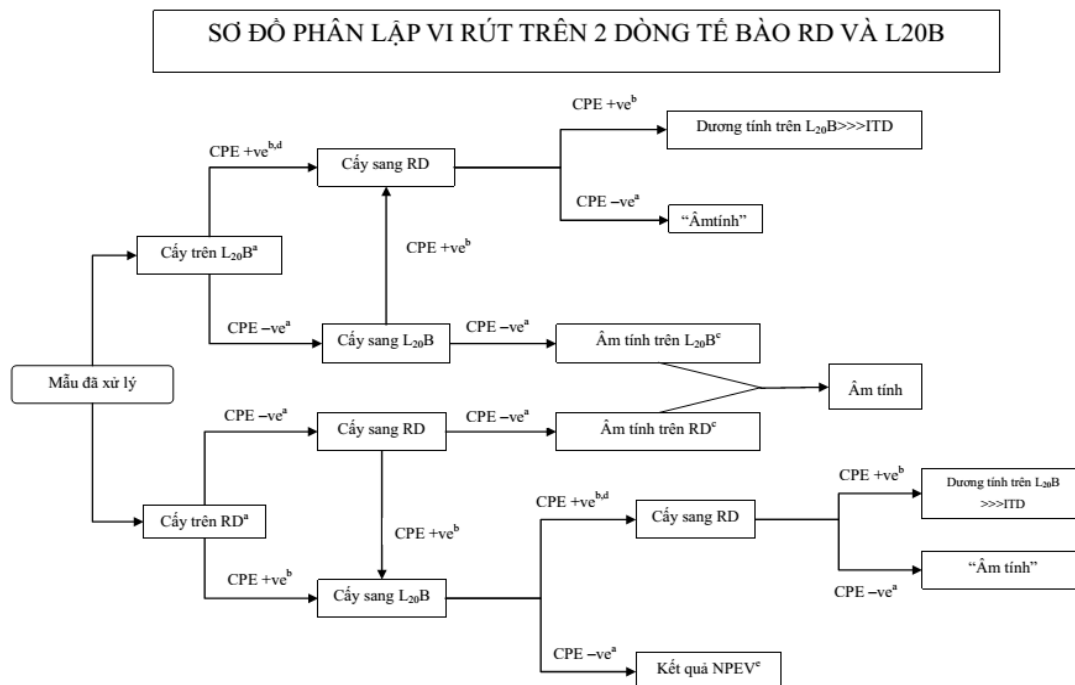
Bước 3: Ghi chép lại các hiện tượng quan sát được trên tuýp nuôi cấy và tế bào chứng. Biểu hiện mức độ hủy hoại tế bào qua các ký hiệu 1+ đến 4+.

- Nếu hiện tượng CPE xuất hiện, theo dõi cho đến khi mức độ tối thiểu đạt 75% (3+) và chuẩn bị cấy truyền lên dòng tế bào khác: Khi mẫu phân lập dương tính trên dòng tế bào L20B, cấy chuyển lên dòng tế bào RD-A (Hình 2). Hiện tượng CPE sẽ xuất hiện trên hầu hết lần cấy truyền này, theo dõi cho đến khi mức độ hủy hoại tối thiểu đạt 3+.

- Nếu CPE không xuất hiện sau 5 ngày ở lần gây nhiễm đầu tiên, thực hiện thêm một bước cấy chuyển lên cùng dòng tế bào. Mẫu được kết luận âm tính trên dòng tế bào nuôi cấy khi không quan sát thấy CPE ở cả 2 lần lây nhiễm và cấy chuyển (Hình 2).

Bước 4: Hỗn dịch tế bào và vi rút của mẫu bệnh phẩm dương tính được hút chuyển vào tuýp có nắp xoáy và lưu giữ trong tủ âm -20°C trong vòng 1 năm và trong tủ âm -70°C trong thời gian lâu hơn để thực hiện các xét nghiệm trung hòa vi

lượng hoặc sinh học phân tử để xác định vi rút đường ruột và vi rút bại liệt (Hình 1).



- a Theo dõi ít nhất trong vòng 5 ngày
- b Theo dõi đến khi ≥ 3 +CPE (thường 1-2 ngày, 5 ngày là tối đa)
- c Tổng thời gian theo dõi ít nhất là 10 ngày
- d Trộn các tube L20B dương tính trước khi cấy truyền sang RD
- e Các chủng NPEV có thể được định typ bằng phương pháp trung hòa vi lượng hoặc snRT-PCR/sequencing

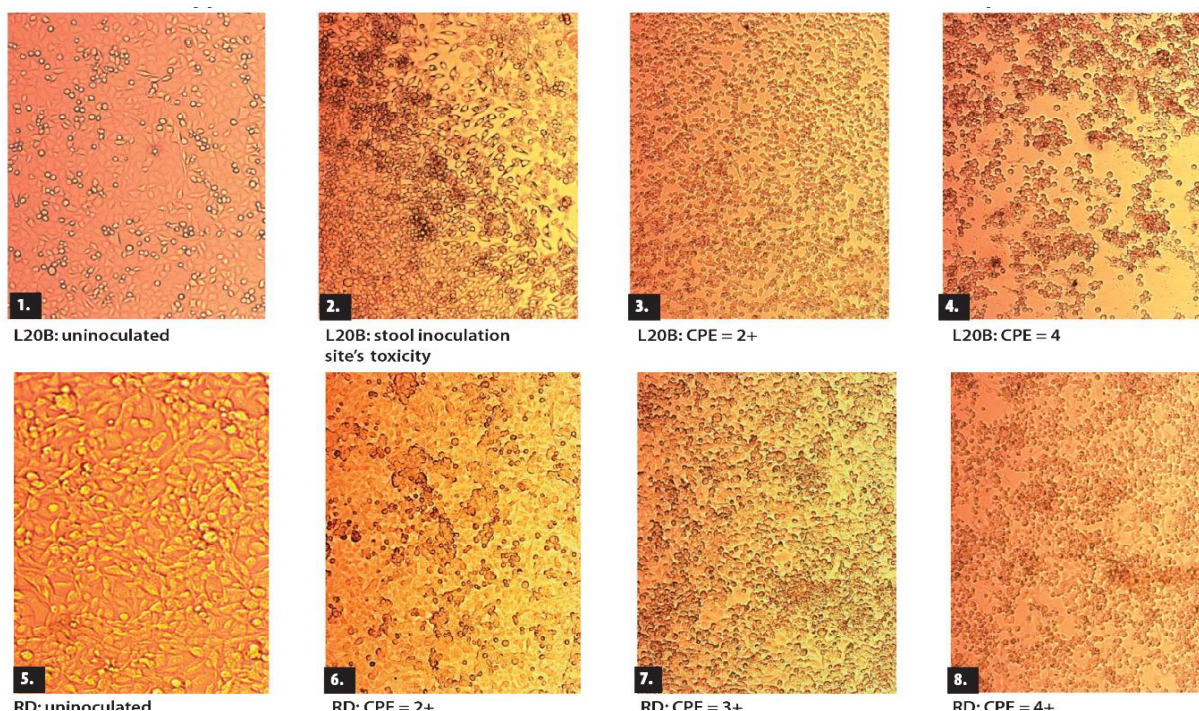
(*) RD: dòng tế bào RD-A

Hình 2. Sơ đồ phân lập vi rút bại liệt trên hai dòng tế bào RD-A và L20B

1.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

1.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Các mẫu dương tính: lớp tế bào bị hủy hoại ở mức độ 3+ và 4+ trong vòng 5 ngày sau khi được gây nhiễm (Hình 3).
- Tế bào chứng: Lớp tế bào bình thường trong suốt thời gian theo dõi.



Hình 3. Các hình ảnh hủy hoại của vi rút bại liệt trên hai dòng tế bào L20B và RD (Nguồn: Mark A. Pallansch và cs.)

1.5.2. Nhận định kết quả

- Cách nhận định mẫu âm tính hoặc dương tính dựa trên hiện tượng hủy hoại tế bào trong vòng 5-7 ngày gây nhiễm: (1) Mẫu âm tính: lớp tế bào không bị hủy hoại; (2) Mẫu dương tính: lớp tế bào bị hủy hoại (CPE) ở mức độ 3+ và 4+, tương ứng 75% và 100% tế bào bị hủy hoại (3) Mẫu nghi ngờ: lớp tế bào không xác định được có chứa vi rút, có độ hủy hoại ở mức độ 1+ đến 2+, tương ứng 25% và 50% tế bào bị hủy hoại.

- Các mẫu dương tính trên dòng tế bào RD-A được xác định dương tính với vi rút đường ruột.

- Các mẫu dương tính trên dòng tế bào L20B (và RD-A) được xác định dương tính với vi rút bại liệt.

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

1.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

2. Định loại týp huyết thanh vi rút bại liệt, phân biệt chủng hoang dại hay có liên quan đến vắc xin (ITD/VDPV) bằng phương pháp rRT-PCR

2.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit Quanta Biosciences qScript XLT One-step RT-qPCR ToughMix được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho quy trình định loại vi rút bại liệt dựa trên phát hiện vật liệu di truyền vi rút bại liệt bằng phương pháp chẩn đoán phân tử (realtime RT-PCR). Quy trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc xác định vi rút bại liệt trong dịch nuôi cấy tế bào L20B (hoặc RD-A) theo thuật toán mới (phiên bản 5.0).

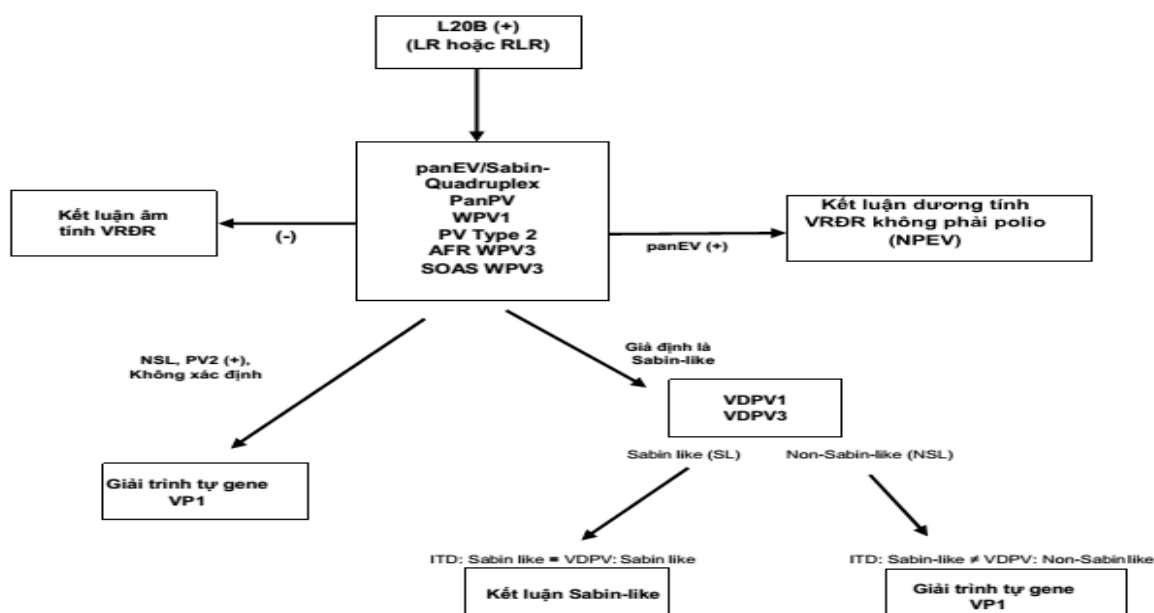
2.2. Nguyên lý

Xét nghiệm vi rút bại liệt dựa trên xét nghiệm phát hiện vật liệu di truyền bằng phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược, thời gian thực (realtime RT-PCR).

Nguyên lý xét nghiệm bao gồm hai bước phản ứng:

- Phản ứng A: Bước sàng lọc để định loại, phân biệt vi rút bại liệt hoang dại và Sabin (rRT-PCR/Polio_ITD v.5.0): Vi rút bại liệt trong mẫu phân lập được xác định kiểu hình bởi phản ứng rRT-PCR sử dụng hỗn hợp các bộ primer/probe phát hiện VRĐR chung và các vi rút bại liệt Sabin (Quadruplex EV+Sabin), vi rút bại liệt chung (PanPV), và vi rút bại liệt hoang dại typ 1, 2 và 3 (WPV1, PV typ 2, WPV3-I, and WPV3-II).

- Phản ứng B: Bước khẳng định vi rút bại liệt có nguồn gốc từ vắc xin typ 1 và 3 (VDPV1 và VDPV3) (rRT-PCR/VDVP): Đối với các chủng vi rút bại liệt được xác định là vi rút bại liệt Sabin typ 1 và 3 trong phản ứng A sẽ được khẳng định là vi rút bại liệt có nguồn gốc từ vắc xin trong phản ứng rRT-PCR tiếp theo, sử dụng hỗn hợp các bộ primer/probe đặc hiệu cho Sabin1 VDPV và Sabin3 VDPV.



Hình 4. Thuật toán mới định loại vi rút bại liệt từ mẫu phân lập bằng phương pháp rRT-PCR_ITD/VDPV v.5.0

2.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

2.4. Thực hiện xét nghiệm

2.4.1. Mẫu bệnh phẩm

Dịch nuôi cấy vi rút có CPE 3+ đến 4+:

- Lấy 40 µl dịch nuôi cấy vi rút vào tuýp eppendorf, ly tâm ở tốc độ 1.500g ở nhiệt độ phòng trong 2 phút.

- Bảo quản ở nhiệt độ -20°C để có thể tái sử dụng nếu cần.

- Khi xét nghiệm lại cần ly tâm lại bệnh phẩm sau khi cất giữ ở -20°C.

Mẫu chứng dương (Chứng dương cần được hồi chỉnh trước khi sử dụng):

- Spin tuýp chứng dương để tập trung thành phần trước khi hồi nước.

- Mỗi tuýp chứng dương cần được hồi với 100 µl nước (đã được cung cấp trong kit).

- Nên chia tuýp chứng dương ra thành một số tuýp với lượng thể tích nhỏ hơn để cất ở -20°C cho nhiều lần sử dụng về sau, để tránh nhiễm chéo và tránh sự tự thủy phân của các RNA.

- Lưu ý trong kit ITD, RNA chứng dương Sabin/ PanPV có thể được dùng cho các phản ứng Quadruplex EV + Sabins; Pan PV, PV týp 2.

- Điều kiện bảo quản: -20°C

2.4.2. Sinh phẩm, hóa chất và vật tư tiêu hao

- Quanta Biosciences qScript XLT One-step RT-qPCR ToughMix (Cat#95132-500)

- Bộ primer/probe cho phản ứng rRT-PCR_ITD v.5.0.

Bảng 4. Thành phần bộ primer và probe cho phản ứng rRT-PCR_ITD

Tên bộ primer và probe	Thành phần primer và probe	Trình tự (5'-3')
Quadruplex + EV	Sabin 1 2S	AGG TCA GAT GCT TGA AAG C
	Sabin 1 A4 (CY5)	CGC CCC CAC CGT TTC ACG GA
	Sabin 1 1A	CCA CTG GCT TCA GTG TTT
	Sabin 2 2S	CCG TTG AAG GGA TTA CTA AA
	Sabin 2 (FAM)	ATT GGT TCC CCC GAC TTC CAC CAA
	Sabin 2 1A	CGG CTT TGT GTC AGG CA

Tên bộ primer và probe	Thành phần primer và probe	Trình tự (5'-3')
	Sabin 3 2S	AGG GCG CCC TAA CTT T
	Sabin 3 (ROX)	TCA CTC CCG AAG CAA CAG
	Sabin 3 1A	TTA CTA TCA GGT AAG CTA TC
	PAN-EV S	GGC CCC TGA ATG CGG CTA ATC C
	PAN-EV Probe (VIC)	CCG ACT ACT TTG GGW GTC CGT GT
	PAN-EV A	GCG ATT GTC ACC ATW AGC AGY CA
Pan Poliovirus	PanPV/ PCR-S1	TTG GAG TTC TTC ACI TAI TCI MGI TTY GAY ATG
	PanPV PCR-1A Probe (FAM)	TGR TTN ARI GCR TGI CCR TTR TT
	PanPV PCR-1A	GGA GCT CCG GGT GGG AYR TAC ATI ATY TGR TAI AC
WPV1	AFRO WPV1-S	GTA CAA ACC AGT CAY GTN AT
	SOAS WPV1-S	CGT ACA GAC TAG RCA YGT NAT
	WPV1-PROBE (FAM)	CAT WAT GGT TAC RCA MGC ACC T
	WPV1-A	GAG AAT AAY TTG TCY TTK GAY GT
Poliovirus Type 2	PV Type 2 S	GAT GCA AAY AAC GGI CAT GC
	PV Type 2 PROBE S (FAM)	ATG ACT ATA CGT GGC AGA C
	PV Type 2 PROBE S 1D (FAM)	CRC CKA TIC CTG GYA
	PV Type 2 A	TCA TAA AAG TGG GAR TAC GCR TT
	PV Type 2 A 1C	TCG TAA AAA TGA GAA TAT GCA TT
AFR WPV3	SOAS WPV3-S	CAG GGA GTA GAT GAY CTN AT

Tên bộ primer và probe	Thành phần primer và probe	Trình tự (5'-3')
	AFRO WPV3-S	CAG GGG GTT GAT GAY TTR AT
	WPV3-PROBE (CY5)	CNC ARA ACA GYC TTC CGG ATA CC
	WPV3-A	ACK GTG TCT GAY GGN AC
SOAS WPV3	SOAS-6S	GTY RTA CAR CGR CGY AGY AGR A
	SOAS-P3W 7S (FAM)	TTC TTY GCA AGI GGR GCR TGY GT
	SOAS-5A	TCY TTR TAI GTR ATG CGC CAA G

- Bộ primer/probe cho phản ứng rRT-PCR VDPV

Bảng 5. Thành phần bộ primer/probe cho phản ứng rRT-PCR VDPV

Tên bộ primer & probe	Thành phần primer & probe	Trình tự mỗi (5' – 3')
S1 VDPV	Sense	CAT GCG TGG CCA TTA TA
	Anti-sense	TAA ATT CCA TAT CAA ATC TA
	22S VP1 Probe FAM	CAC CAA GAA TAA GGA TAA G- BHQ1
S3 VDPV	Sense	CAT TTA CAT GAA ACC CAA AC
	Anti-sense	TGG TCA AAC CTT TCT CAG A
	12S VP1 Probe FAM	AGG AAC AAC TTG GAC- BHQ1

- Găng tay, khẩu trang, tuýp ly tâm 1.5 ml vô trùng, tuýp ly tâm 2.0 ml vô trùng, đầu côn lọc 10; 30; 100; 200 và 1000 µl, tuýp tiết trùng: 0.2, 0.5 và 1.7 ml, giá tích lạnh, tuýp 0,1 ml hoặc strip 8 tuýp 0.1ml có nắp dành cho rRT-PCR.

2.4.3. Các bước thực hiện

a. rRT-PCR_ITD: bước 1 đến 5

Bước 1: Chuẩn bị bảng xét nghiệm (worksheet) để làm rRT-PCR_ITD:

- Điền vào các worksheet chạy rRT-PCR_ITD các thông tin về tên người làm thí nghiệm, ngày tháng, thông tin sinh phẩm, tên mẫu và thứ tự mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng.

- Mỗi mẫu bệnh phẩm sẽ phải thực hiện với 06 phản ứng (Quadruplex EV+Sabin Primers/probes, Pan Poliovirus , WPV1, PV type 2, AFR WPV3, SOAS WPV3).

Bảng 6. Sơ đồ bố trí xét nghiệm cho phản ứng rRT-PCR_ITD

Cột/ hàng	Lab Sample No.	Quadruplex EV+Sabin Primers/probes	Pan Poliovirus	WPV1	PV2	AFR WPV3	SOAS WPV3
		1	2	3	4	5	6
A	NTC						
B	PC						
C	Bệnh phẩm 1						
D	Bệnh phẩm 2						
							

Bước 2. Làm tan băng mẫu và hóa chất sinh phẩm, để ở nhiệt độ phòng, riêng enzyme để trong khay đá lạnh.

Bước 3. Pha sinh phẩm và cho mẫu bệnh phẩm vào hỗn dịch phản ứng:

- Đánh dấu tuýp 1,5 ml cho mỗi bộ primer/probe (tuýp 1 đến 6 theo sơ đồ xét nghiệm (Bảng 6)).

- Mỗi phản ứng sẽ gồm 10 µl Toughmix, 1 µl hỗn hợp primer/probe tương ứng và 8 µl nước.

- Mỗi tuýp phản ứng sẽ gồm 19 µl hỗn hợp phản ứng trên và 1 µl mẫu hoặc chứng dương (tổng thể tích 1 phản ứng = 20 µl).

Bảng 7. Thành phần pha sinh phẩm cho phản ứng rRT-PCR_ITD

STT	Thành phần	Thể tích (µl)	Thể tích cho N phản ứng (µl)
1	Toughmix	10	10 x N
2	Hỗn hợp Primer/Probe	1	1 x N
3	Nước sử dụng cho sinh học phân tử	8	8 x N
	Tổng hỗn dịch	19	19 x N
4	Mẫu bệnh phẩm hoặc chứng dương	1	
	Tổng phản ứng	20	

Bước 4. Đặt các tuýp vào máy, khởi động chương trình theo yêu cầu xét nghiệm. Tạo tên tệp và lưu giữ dữ liệu. Ghi chép mã thiết bị sử dụng, ngày sử dụng vào biểu mẫu theo quy định của phòng thí nghiệm.

Bảng 8. Thông số chu trình nhiệt rRT-PCR_ITD

	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Chu kỳ lặp
RT	50	30:00	} x 1
Bất hoạt RT	95	1:00	
Chu kỳ PCR	95	00:15	} x 40
	50	00:45	
	Thu tín hiệu huỳnh quang		
	72	00:05	25% ramp speed

Lưu ý: Đối với ABI 7500, ta luôn đặt 25% tốc độ gia nhiệt (ramp speed) giữa nhiệt độ gắn môi và nhiệt độ kéo dài cho tất cả các quy trình. Stratagene Mx3000P và các máy khác không có chức năng điều chỉnh sự gia nhiệt này nên có thể sử dụng thời gian gia nhiệt đã đặt sẵn (default ramp capabilities). Tín hiệu huỳnh quang được thu nhận vào cuối bước gắn môi.

Bước 5. Đọc và phiên giải kết quả, xác định mẫu cần làm tiếp rRT-PCR VDPV (xem thêm mục 2.5.2.a, bảng 10).

b. rRT-PCR VDPV: bước 6 đến bước 9

Bước 6. Chuẩn bị worksheet để làm rRT-PCR VDPV

- Điền vào các worksheet chạy rRT-PCR VDPV các thông tin về tên người làm thí nghiệm, ngày tháng, thông tin sinh phẩm, tên mẫu và thứ tự mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng.

- Mỗi mẫu bệnh phẩm sẽ phải thực hiện số phản ứng dựa trên kết luận của phản ứng ITD (hoặc chỉ Sabin1, hoặc chỉ Sabin 3 hoặc Sabin1+Sabin3)

Bảng 9. Sơ đồ bố trí xét nghiệm cho phản ứng rRT-PCR VDPV

Cột/ hàng	Mẫu xét nghiệm	Thành phần môi và probe (VDPV 4.0)	
		S1 VDPV primers/probe (1)	S3 VDPV primers/probe (2)
A	NTC	x	x
B	PC	x	x
C	Mẫu 1 /SABIN1	x	

Cột/ hàng	Mẫu xét nghiệm	Thành phần môi và probe (VDPV 4.0)	
		S1 VDPV primers/probe (1)	S3 VDPV primers/probe (2)
D	Mẫu 2 /SABIN 3		x
E	Mẫu 3 /SB1+SB3	x	x

Bước 7. Làm tan băng mẫu và hóa chất sinh phẩm rRT-PCR VDPV, để ở nhiệt độ phòng; enzyme để trong khay đá lạnh.

Bước 8. Pha sinh phẩm và cho mẫu bệnh phẩm vào hỗn dịch phản ứng [tương tự thành phần sinh phẩm của phản ứng rRT-PCR_ITD (Bảng 7)]:

- Đánh dấu tuýp 1,5 ml cho mỗi bộ primer/probe (Bảng 9)
- Mỗi phản ứng sẽ gồm 10 µl Toughmix, 1 µl hỗn hợp primer/probe tương ứng và 8 µl nước sử dụng cho sinh học phân tử.
- Mỗi tuýp phản ứng sẽ gồm 19 µl hỗn hợp phản ứng trên và 1 µl mẫu hoặc chứng dương (tổng thể tích 1 phản ứng là 20 µl).

Bước 9. Thực hiện tương tự bước 4 trong phương pháp này.

2.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

2.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Chứng dương: có tín hiệu huỳnh quang phù hợp theo hướng dẫn nhà sản xuất hoặc theo quy định của phòng xét nghiệm.
- Chứng âm: không có tín hiệu huỳnh quang.
- Giá trị ngưỡng của chu trình (cycle threshold value) Ct là số chu trình tại đó sản phẩm PCR được phát hiện qua tín hiệu huỳnh quang. Kết quả đọc được khi giá trị Ct khoảng ≥ 10 . Giá trị này sẽ được phần mềm của máy realtime tính toán tự động. Có thể tự điều chỉnh đường baseline của Ct cho phù hợp với chứng âm.
- Giá trị cut-off của Ct không áp dụng. Các mẫu có giá trị Ct < 37 nhưng có hình ảnh huỳnh quang phẳng, chỉ hơi nhích lên phía trên trục X thì phần nhiều là âm tính, cần chạy lại, sử dụng ARN đã tách chiết. Các mẫu có giá trị Ct ≥ 37 tín hiệu nền cần định giá dựa dựa trên tín hiệu của chứng âm.
- Kiểm tra chứng dương, chứng âm trước khi đọc kết quả của mẫu. Kết quả chỉ đọc được khi tuân theo hướng dẫn phân tích kết quả của kit ITD 5.0 đã ban hành.

2.5.2. Nhận định kết quả

- Mẫu dương tính khi tín hiệu huỳnh quang vượt trên giá trị nền và có dạng đường cong điển hình (S-curve).
- Mẫu âm tính khi không có tín hiệu huỳnh quang hoặc tín hiệu huỳnh quang không có dạng đường cong điển hình và thấp hơn giá trị nền (hình ảnh huỳnh quang phẳng).

- Mẫu nghi ngờ khi mẫu có giá trị Ct ≤ 32 nhưng hình ảnh huỳnh quang phẳng hoặc hình ảnh huỳnh quang tăng chỉ trên trục X nhìn giống âm tính thì cần lặp lại phản ứng, sử dụng RNA tách chiết.

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

a. Nhận định kết quả phản ứng rRT-PCR_ITD

Bảng 10. Giải thích kết quả mẫu bệnh phẩm và yêu cầu cho thử nghiệm VDPV hoặc giải trình tự vùng VP1

PanEV	Pan PV	Sab 1	Sab 2	Sab3	WPV1	SOAS WPV3	AFR WPV3	PV type 2	Kết quả	Kết luận
-	-	-	-	-	-	-	-	-	NEV	Báo cáo âm tính VRĐR
+	-	-	-	-	-	-	-	-	NPEV	Báo cáo dương tính với VRĐR
+	+	-	-	-	-	-	-	-	Không xác định	Chuyển giải trình tự
+	+	+	-	-	-	-	-	-	SL1	Thực hiện tiếp VDPV S1*
+	+	-	+	-	-	-	-	+	PV2	Giải trình tự
+	+	-	-	-	-	-	-	+	PV2	Giải trình tự
+	+	-	-	+	-	-	-	-	SL3	VDPV S3*
+	+	-	-	-	+	-	-	-	NSL1	Giải trình tự
+	+	-	-	-	-	+	+	-	NSL3	Giải trình tự
+	+	-	-	-	-	+	-	-	NSL3	Giải trình tự
+	+	-	-	-	-	-	+	-	NSL3	Giải trình tự

Ghi chú: + dương tính; - âm tính; Đối với những trường hợp (): tiến hành xét nghiệm từ bước 7 đến bước 9.*

b. Nhận định kết quả phản ứng rRT-PCR_VDPV:**Bảng 11. Giải thích kết quả rRT-PCR/VDPV**

Mẫu	Kết quả	Kết luận
NTC	Âm tính	Đạt
PC	Dương tính	Đạt
Mẫu 1/SABIN1	SL1	Ghi nhận kết quả
	NSL1	Báo cáo kết quả và chuyển giải trình tự.
Mẫu 2/SABIN 3	SL3	Ghi nhận kết quả
	NSL1	Báo cáo kết quả và chuyển giải trình tự.
Mẫu 3/SB1+SB3	SL1/SL3	Ghi nhận kết quả
	NSL1/ NSL3	Báo cáo kết quả và chuyển giải trình tự.

2.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

3. Xác định vi rút đường ruột bằng phương pháp trung hòa vi lượng**3.1. Phạm vi áp dụng**

Trong nội dung hướng dẫn này môi trường tự pha chế được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho quá trình định danh vi rút đường ruột (vi rút bại liệt và 27 loại vi rút đường ruột khác) từ dịch nổi nuôi cấy vi rút bằng kỹ thuật trung hòa trên dòng tế bào RD-A theo thường quy của WHO.

3.2. Nguyên lý

Vi rút đường ruột có khả năng trung hòa với kháng huyết thanh đặc hiệu ở nồng độ 20 đơn vị trung hoà kết hợp với 100 TCID₅₀ (CCID₅₀) của vi rút. Một lượng vi rút gây hủy hoại tế bào (3+ hoặc 4+) có thể có hiệu giá khoảng 10⁵-10⁶ CCID₅₀/50μl, quy đổi nồng độ vi rút đảm bảo cho phản ứng trung hòa sẽ ở độ pha loãng 10⁻³ đến 10⁻⁴. Mỗi mẫu vi rút chưa định danh sẽ được kiểm tra phản ứng trung hòa với một hỗn dịch kháng huyết thanh của vi rút bại liệt 1, 2 và 3 (PP), một hỗn dịch kháng huyết thanh của vi rút coxsackie B1 đến B6 (CB) và 7 hỗn dịch kháng huyết thanh của vi rút coxsackie A9 và 20 vi rút echo (A-G). Dựa vào phản ứng trung hòa của vi rút trong mẫu bệnh phẩm với kháng thể đặc hiệu để định danh vi rút đường ruột (vi rút được trung hòa với kháng thể đặc hiệu tương ứng sẽ không gây hủy hoại tế bào trong giếng kiểm tra). Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp là chỉ phát hiện được vi rút coxsackie B1 đến B6, vi rút coxsackie A9 và 20 loại vi rút echo.

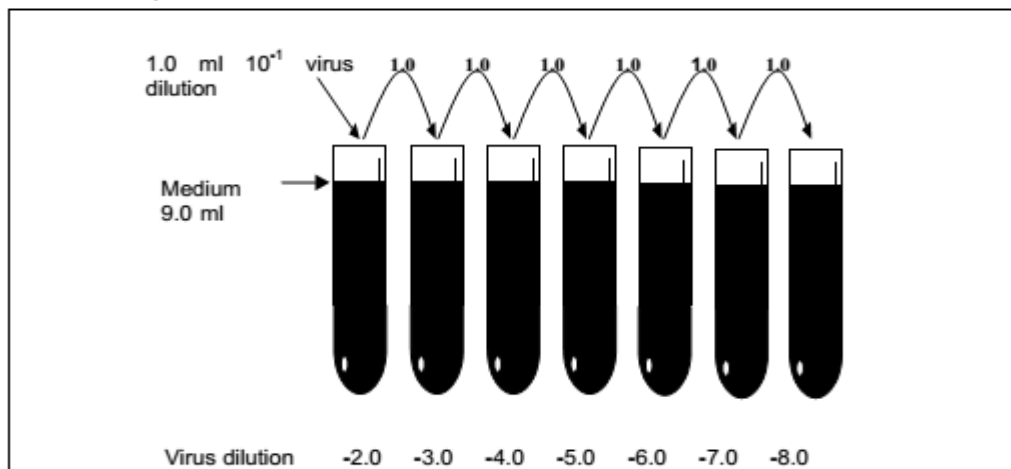
3.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

3.4. Thực hiện xét nghiệm

3.4.1. Mẫu bệnh phẩm

Dịch nổi vi rút nuôi cấy đã được rã đông và giữ ở 4°C trong quá trình xét nghiệm. Dịch vi rút nuôi cấy được pha loãng bậc 10, từ nồng độ 10^{-1} đến 10^{-8} trước khi thực hiện xét nghiệm. Các bước thực hiện như sau (Hình 5):



(Nguồn: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68762/1/WHO_IVB_04.10.pdf)

Hình 5. Pha loãng bậc 10 dịch nổi vi rút nuôi cấy

- Dùng bút lông ghi nhãn mẫu, nồng độ pha loãng vi rút (10^{-1} , 10^{-2} ... 10^{-8}) lên các tuýp 5ml vô trùng.
- Cho 900 μ l môi trường duy trì lần lượt vào từng tuýp pha loãng.
- Sau đó dùng đầu côn có lọc cho 100 μ l hỗn dịch vi rút vào tuýp số 1 (nồng độ pha loãng 10^{-1})
- Trộn đều hỗn hợp trên bằng máy trộn, tránh tạo bọt và hút 100 μ l chuyển sang tuýp thứ 2, và lần lượt như vậy cho đến tuýp pha loãng cuối cùng 10^{-8} , chú ý mỗi nồng độ pha loãng thì phải thay đầu côn.

Lưu ý: Trước khi thực hiện phản ứng trung hòa, có thể tiến hành phản ứng xác định hiệu giá của chủng vi rút dựa trên loạt pha loãng cấp độ 10. Dựa trên kết quả thu được, tính độ pha loãng mẫu cho phản ứng trung hòa, là độ pha loãng vi rút sử dụng là 100 đơn vị CCID₅₀.

3.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Môi trường duy trì MEM có bổ sung FBS 2% (Bảng 4).
- Chai tế bào RD-A đã mọc tốt thành một lớp mỏng.
- Môi trường PBS (-) có kháng sinh.
- Trypsin Versin.

- Kháng huyết thanh đặc hiệu: Một hỗn hợp kháng huyết thanh vi rút cosackieB1-6 (CB), bảy hỗn hợp kháng huyết thanh kháng vi rút coxsackie A9 và 20 vi rút echo (A-G), một hỗn hợp kháng huyết thanh bại liệt P1-3(PP).

- Tế bào RD-A, L20B.
- Tấm nhựa 96 giếng đáy phẳng dùng 1 lần.
- Pi pét Aid.
- Đầu côn vô trùng có lọc 1000 μ l.
- Pi pét 1000 μ l.
- Pi pét nhựa 5ml hoặc 10 ml.
- Tuýp đựng môi trường vô trùng.
- Găng tay dùng 1 lần.
- Bút viết.

3.4.3. Các bước thực hiện

Bước 1. Chuẩn bị:

- Thực hiện trong tủ ATSH phù hợp.
- Để môi trường, kháng huyết thanh, bệnh phẩm ở nhiệt độ phòng trước khi thực hiện.

- Dùng bút ghi mã số mẫu trung hoà, các loại kháng huyết thanh, chứng vi rút, chứng tế bào trên nắp tấm 96 giếng. Ghi ngày làm, mã số tấm, tên dòng tế bào RD-A ở cạnh bên của tấm. Mỗi tấm xét nghiệm với 02 mẫu bệnh phẩm.

Bước 2. Cho kháng huyết thanh và môi trường duy trì vào tấm phản ứng.

- Cho 50 μ l kháng huyết thanh VRĐR A-G, PP và CB vào giếng phản ứng (Hình 6). Thay đầu côn khi nhỏ các loại kháng huyết thanh khác nhau.
- Cho 50 μ l môi trường duy trì vào các giếng chứng vi rút cột 10-11 từ hàng A đến H để chuẩn độ ngược vi rút.
- Cho 100 μ l môi trường duy trì vào các giếng chứng tế bào cột 12 từ hàng A đến H.

Bước 3. Cho vi rút vào tấm phản ứng:

- Mẫu bệnh phẩm số 1: Cho 50 μ l mẫu bệnh phẩm số 1 nồng độ 10^{-8} vào 4 giếng ở cột 8, 7 hàng E, F; lần lượt như vậy ở nồng độ $10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}$, vào mỗi giếng lần lượt ở cột 6, 5; 4, 3; 2, 1 hàng E, F. Tiếp theo cho 50 μ l hỗn hợp mẫu đã pha loãng ở nồng độ 10^{-4} vào mỗi giếng hàng B, cột 1-11; và 10^{-3} vào mỗi giếng hàng A cột 1-11.

- Mẫu bệnh phẩm số 2: tương tự mẫu bệnh phẩm số 1, sử dụng hàng C-D và G-H.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kháng huyết thanh		A	B	C	D	E	F	G	PP	CB	VC*	CC**	
Mẫu số 1	10 ⁻³	A	-3										
	10 ⁻⁴	B	-4										

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kháng huyết thanh		A	B	C	D	E	F	G	PP	CB	VC*	CC**	
Mẫu số 2	10^{-3}	C	-3										
	10^{-4}	D	-4										
Chuẩn độ ngược – Mẫu số 1		E											
		F											
Chuẩn độ ngược – Mẫu số 2		G											
		H											
			10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}							

(*)VC: virus control: vi rút chứng; (**)CC: cell control: tế bào chứng

Hình 6. Sơ đồ bố trí xét nghiệm phản ứng trung hòa xác định các VRĐR

Bước 4. Đậy nắp tấm và ủ trong tủ ẩm CO₂ khoảng 2 đến 3 giờ ở 36°C.

Bước 5. Chuẩn bị tế bào RD-A với nồng độ 2×10^5 tế bào/ml (ít nhất 10 ml/tấm).

Bước 6. Cho tế bào vào tấm phản ứng: dùng pipet 8 kênh cho 100 µl tế bào vào tất cả các giếng.

Bước 7. Ủ tấm và quan sát hiện tượng hủy hoại:

- Sau đó cho vào tủ ẩm CO₂ ở 36°C.

- Quan sát kết quả hằng ngày bằng kính hiển vi lộn ngược và ghi nhận sự hủy hoại tế bào.

- Tiếp tục quan sát và ghi nhận kết quả sau 24 giờ khi các giếng chứng vi rút đã hủy hoại hoàn toàn (100% CPE thường từ 3-5 ngày).

3.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

3.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Chứng dương - Vi rút chứng: Tế bào bị hủy hoại hoàn toàn.

- Chứng âm - Tế bào chứng: Tế bào phải tạo 1 lớp bình thường.

- Kết quả chuẩn độ lại: Đảm bảo hiệu giá vi rút đủ 30 - 300 TCID₅₀. Nếu hiệu giá vi rút trong phản ứng không nằm trong khoảng phù hợp, nên lặp lại xét nghiệm với nồng độ pha loãng thấp hoặc cao hơn, đảm bảo lượng vi rút phù hợp cho phản ứng.

3.5.2. Nhận định kết quả

- Mẫu dương tính khi virus trung hòa với kháng huyết thanh và không gây hủy hoại tế bào trong thời gian xét nghiệm

- Mẫu âm tính khi virus không được trung hòa với kháng huyết thanh và gây hủy hoại tế bào độ 3+ và 4+

- Mẫu nghi ngờ: khi virus gây hủy hoại tế bào ở mức độ 1+ và 2+ trong vòng 7 ngày thí nghiệm.

Bảng 12. Sơ đồ đọc kết quả các VRĐR

Hỗn hợp KT	Tình trạng tế bào	Kết quả
A&B	Tế bào bình thường	ECHO 4
A&C	Tế bào bình thường	ECHO 7
A&D	Tế bào bình thường	ECHO 11
A&E	Tế bào bình thường	ECHO 14
A&F	Tế bào bình thường	ECHO 9
A&G	Tế bào bình thường	ECHO 6
B&C	Tế bào bình thường	CoxsackieA9
B&D	Tế bào bình thường	ECHO 1
B&E	Tế bào bình thường	ECHO 27
B&F	Tế bào bình thường	ECHO 3
B&G	Tế bào bình thường	ECHO 25
C&D	Tế bào bình thường	ECHO 21
C&E	Tế bào bình thường	ECHO 22
C&F	Tế bào bình thường	ECHO 2
C&G	Tế bào bình thường	ECHO 5
D&E	Tế bào bình thường	ECHO 20
D&F	Tế bào bình thường	ECHO 12
D&G	Tế bào bình thường	ECHO 30
E&F	Tế bào bình thường	ECHO 33
E&G	Tế bào bình thường	ECHO 29
F&G	Tế bào bình thường	ECHO 13
PP	Tế bào bình	Polio
CB	Tế bào bình	Coxsackie B

Ví dụ đọc kết quả:

- Giếng có hỗn hợp KHT A và B mà tế bào bình thường, các giếng khác tế bào huỷ hoại hoàn toàn nghĩa là vi rút phân lập được thuộc vi rút echo týp 4.

- Giếng có hỗn hợp KHT A và C mà tế bào bình thường nghĩa là vi rút phân lập được thuộc vi rút echo týp 7...
- Giếng có hỗn hợp KHT PP mà tế bào bình thường, các giếng khác tế bào huỷ hoại hoàn toàn nghĩa là vi rút phân lập được thuộc vi rút bại liệt.
- Đối với mẫu dương tính với vi rút bại liệt, cần tiến hành phản ứng trung hòa vi lượng xác định kiểu týp huyết thanh 1, 2, hoặc 3 của vi rút bại liệt hoặc thực hiện phản ứng rRT-PCR_ITD định loại vi rút bại liệt (Hình 1).
- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

3.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

4. Xác định týp huyết thanh của vi rút bại liệt bằng phương pháp trung hòa vi lượng

4.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này môi trường tự pha chế được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho quá trình định danh týp huyết thanh của vi rút bại liệt từ dịch nổi nuôi cấy vi rút bằng phương pháp trung hòa vi lượng trên dòng tế bào L20B (thường được sử dụng) và RD-A.

4.2. Nguyên lý

Vi rút bại liệt có khả năng trung hòa với kháng huyết thanh đặc hiệu týp huyết thanh ở nồng độ TCID₅₀ (CCID₅₀) của vi rút. Một lượng vi rút gây huỷ hoại tế bào (3+ hoặc 4+) có thể có hiệu giá khoảng 10^5 - 10^6 CCID₅₀/50 μ l, quy đổi nồng độ vi rút đảm bảo cho phản ứng trung hòa sẽ ở độ pha loãng 10^{-3} đến 10^{-4} . Vi rút trong mẫu bệnh phẩm sẽ được trung hòa với kháng thể đặc hiệu trên tế bào để định danh vi rút bại liệt.

Hạn chế: Chỉ có thể định danh các týp huyết thanh vi rút bại liệt, không phân biệt được vi rút hoang dại hay Sabin.

4.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

4.4. Thực hiện xét nghiệm

4.4.1. Mẫu bệnh phẩm

Dịch nổi nuôi cấy tế bào của mẫu bệnh phẩm đã xác định dương tính với vi rút bại liệt. Dịch vi rút nuôi cấy được pha loãng bậc 10, từ nồng độ 10^{-1} đến 10^{-8} trước khi thực hiện xét nghiệm (tham khảo cách pha loãng tại mục 3.4.1).

4.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Môi trường MEM duy trì (Bảng 4).

- Chai tế bào L20B hoặc RD đã mọc tốt thành một lớp mỏng.
- Môi trường PBS (-) có kháng sinh.
- Trypsin Versin.
- Kháng huyết thanh đặc hiệu: 1 hỗn hợp kháng huyết thanh bại liệt (P1+2+3), 1 kháng huyết thanh hỗn hợp bại liệt týp 1 và bại liệt týp 2 (P1+2), 1 kháng huyết thanh hỗn hợp bại liệt týp 2 và bại liệt týp 3 (P2+3), 1 kháng huyết thanh hỗn hợp bại liệt týp 1 và bại liệt týp 3 (P1+3). Kháng huyết thanh được pha loãng trong môi trường duy trì đạt được mức 20 đơn vị hoạt động.
- Tấm nhựa 96 giếng đáy phẳng vô trùng dùng 1 lần.
- Đầu côn vô trùng có lọc 1000 μ l, 200 μ l.
- Pi pét man 1000 μ l, 200 μ l và pi pét 8 kênh; pi pét Aid.
- Pi pét nhựa vô trùng 1ml, 5ml, 10ml.
- Tuýp đựng môi trường vô trùng.
- Găng tay dùng 1 lần.
- Bút viết.
- Sổ định týp vi rút bại liệt.

4.4.3. Các bước thực hiện

Bước 1. Chuẩn bị:

- Thực hiện trong tủ ATSH phù hợp.
- Để môi trường, kháng huyết thanh, bệnh phẩm ở nhiệt độ phòng trước khi thực hiện.
- Dùng bút lông ghi mã số mẫu trung hoà, các loại kháng huyết thanh, chứng vi rút, chứng tế bào trên nắp tấm 96 giếng. Ghi ngày làm, mã số tấm, tên dòng tế bào (RD-A hoặc L20B) và đời tế bào ở cạnh bên của tấm.

Bước 2. Cho kháng huyết thanh và môi trường duy trì theo sơ đồ phản ứng (Hình 6). Trộn đều kháng huyết thanh trước khi nhỏ. Thay đầu côn khi nhỏ các loại kháng huyết thanh khác nhau.

- Cho 50 μ l hỗn hợp KHT P1 + P2 +P3 vào cột 1 và 2 từ hàng A đến hàng D.
- Cho 50 μ l hỗn hợp KHT P1 + P2 vào hàng 3 và 4 từ hàng A đến hàng D.
- Cho 50 μ l hỗn hợp KHT P1 + P3 vào hàng 5 và 6 từ hàng A đến hàng D.
- Cho 50 μ l hỗn hợp KHT P2 + P3 vào hàng 7 và 8 từ hàng A đến hàng D.
- Cho 50 μ l môi trường duy trì vào các giếng chứng vi rút từ A9 đến B10 và cột 1 đến cột 10 hàng E, F để chuẩn độ ngược.
- Cho 100 μ l môi trường duy trì vào các giếng chứng tế bào từ G11 đến H12.

				P1+2+3	P1+P2	P1+P3	P2+P3	VC*	CC**				
Mẫu số 1	10 ⁻³	A											
	10 ⁻⁴	B											

		P1+2+3		P1+P2		P1+P3		P2+P3		VC*		CC**	
Mẫu số 2	10^{-3}	C											
	10^{-4}	D											
Chuẩn độ ngược – Mẫu số 1		E											
		F											
Chuẩn độ ngược – Mẫu số 2		G											
		H											
			10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	CC					

Ghi chú: (*) VC: virus control: chứng vi rút; (**) CC: cell control: chứng tế bào

Hình 7. Sơ đồ bố trí xét nghiệm phản ứng trung hòa định typ vi rút bại liệt

Bước 3. Cho hỗn hợp vi rút đã pha loãng vào tấm phản ứng

- Cho 50 μ l hỗn hợp đã pha loãng ở nồng độ 10^{-7} vào 4 giếng ở cột 9, 10 hàng E, F lần lượt như vậy ở nồng độ $10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}$ vào mỗi giếng lần lượt ở cột 7, 8; 6, 5; 4, 3; 2, 1 hàng E, F.

- Cho 50 μ l hỗn hợp đã pha loãng ở nồng độ 10^{-3} vào mỗi giếng từ 1-10 hàng A, và 10^{-4} vào mỗi giếng từ 1-10 hàng B.

- Mỗi tấm 96 giếng có thể sử dụng cho 2 mẫu, mẫu thứ 2 tương tự, sử dụng hàng C, D và G, H.

Bước 4. Đậy nắp tấm và ủ trong tủ ẩm CO_2 trong khoảng từ 1 đến 3 giờ ở 36°C .

Bước 5. Chuẩn bị tế bào L20B hoặc RD-A với số lượng 2×10^5 tế bào/ml (ít nhất 10ml/tấm).

Bước 6. Nhỏ tế bào vào tấm phản ứng; dùng pipet 8 kênh cho 100 μ l tế bào vào tất cả các giếng.

Bước 7. Ủ tấm phản ứng và quan sát sự hủy hoại tế bào:

- Ủ tấm trong tủ ẩm CO_2 ở 36°C .

- Quan sát kết quả hàng ngày bằng kính hiển vi lộn ngược và ghi nhận sự hủy hoại tế bào.

- Tiếp tục quan sát và ghi nhận kết quả trong vòng 24 giờ sau khi các giếng chứng vi rút đã hủy hoại hoàn toàn (100% CPE thường từ 3-5 ngày).

4.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

4.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Chứng dương - Vi rút chứng: Tế bào bị hủy hoại hoàn toàn.

- Chứng âm - Tế bào chứng: Tế bào phải tạo 1 lớp bình thường.

- Kết quả chuẩn độ lại: Đảm bảo hiệu giá vi rút đủ 32 - 320 CCID₅₀. Nếu hiệu giá vi rút trong phản ứng không nằm trong khoảng phù hợp, nên lặp lại xét nghiệm với nồng độ pha loãng thấp hoặc cao hơn, đảm bảo lượng vi rút phù hợp cho phản ứng.

4.5.2. Nhận định kết quả

- Mẫu dương tính khi virus trung hòa với kháng huyết thanh và không gây hủy hoại tế bào trong thời gian xét nghiệm.

- Mẫu âm tính khi virus không được trung hòa với kháng huyết thanh và gây hủy hoại tế bào độ 3+ và 4+.

- Mẫu nghi ngờ: khi virus gây hủy hoại tế bào ở mức độ 1+ và 2+ trong vòng 7 ngày thực hiện thí nghiệm.

- Giải thích kết quả: Theo sơ đồ đọc kết quả định typ vi rút Bại liệt (Bảng 13).

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

Bảng 13. Sơ đồ đọc kết quả định typ vi rút Bại liệt

Hỗn hợp KHT 1+2+3	Hỗn hợp KHT 1+2	Hỗn hợp KHT 1+3	Hỗn hợp KHT 2+3	Kết quả
0	0	0	+	P1
0	0	+	0	P2
0	+	0	0	P3
0	0	+	+	P1+P2
0	+	0	+	P1+P3
0	+	+	0	P2+P3
0	+	+	+	P1+P2+P3
+	+	+	+	VRĐR khác

Ghi chú: (+) tế bào hủy hoại hoàn toàn

(0) tế bào bình thường.

4.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

IV. Tài liệu tham khảo

1. Quyết định 5142/QĐ-BYT ngày 11/12/2014 của Bộ Y tế ban hành “Hướng dẫn giám sát và phòng chống bệnh bại liệt”.

2. World Health Organization. (2004). Polio laboratory manual, 4th edition. Geneva: World Health Organization.
3. Gregory S Wallace; M. Steven Oberste. Chapter 12: Poliomyelitis. VPD Surveillance Manual, 5th Edition, 2012 Poliomyelitis: Chapter 12-1.
4. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. 2006. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 44:2698-704.
5. Arita M, Kilpatrick DR, Nakamura T, Burns CC, Bukbuk D, Oderinde SB, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA, Shimizu H. 2015. Development of an efficient entire-capsid-coding-region amplification method for direct detection of poliovirus from stool extracts. *J Clin Microbiol.* 02384-14.
6. Poliovirus rRT-PCR ITD 5.0 Kit: A screening kit for the intratypic differentiation of polioviruses in support of the Global bại liệt Eradication Initiative.
7. Poliovirus ITD 5.0 and VDPV 4.1 RT-PCR Training Manual.
8. Gerloff N, Sun H, Mandelbaum M, Maher C, Nix WA, Zaidi S, Shaukat S, Seakamela L, Nalavade UP, Sharma DK, Oberste MS, Vega E. 2018. Diagnostic Assay Development for Poliovirus Eradication. *J Clin Microbiol.* e01624-17.

BỆNH BẠCH HẦU (DIPHTHERIA)

Bệnh truyền nhiễm thuộc nhóm B trong Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm

I. Mô tả chung

Bệnh bạch hầu (*Diphtheria*) do vi khuẩn *Corynebacterium diphtheriae* gây ra, là bệnh nhiễm khuẩn cấp tính có màng giả ở tuyến hạnh nhân, hầu họng, thanh quản, mũi. Bệnh có thể xuất hiện ở da, các màng niêm mạc khác như kết mạc mắt hoặc bộ phận sinh dục. Đây là một bệnh vừa nhiễm trùng vừa nhiễm độc và các tổn thương nghiêm trọng của bệnh chủ yếu là do ngoại độc tố của vi khuẩn bạch hầu gây ra. Màng giả đặc trưng của bệnh bạch hầu là dày, dai, màu xám nhạt hoặc trắng chứa vi khuẩn, tế bào biểu mô hoại tử, đại thực bào và fibrin. Màng dính chặt vào niêm mạc cơ và có thể lan truyền xuống phế quản, gây tắc nghẽn đường hô hấp và khó thở. Tử vong chủ yếu do màng giả phát triển rất nhanh làm tắc nghẽn đường hô hấp trên hoặc tác hại của độc tố lên tim hoặc hệ thần kinh.

Bệnh bạch hầu lưu hành rộng rãi ở mọi nơi trên thế giới và đã gây nên các vụ dịch nghiêm trọng, nhất là ở trẻ em trong thời kỳ chưa có vắc xin dự phòng. Năm 1923, vắc xin giải độc tố bạch hầu ra đời và từ đó đến nay tính nghiêm trọng của bệnh dịch đã thay đổi trên toàn thế giới.

Bệnh bạch hầu thường xuất hiện trong những tháng lạnh ở vùng ôn đới. Bệnh có tính mùa, thường tản phát, có thể phát triển thành dịch nhất là ở trẻ dưới 15 tuổi chưa được gây miễn dịch đầy đủ.

Ở khu vực Tây Thái Bình Dương, hiện nay số mắc bệnh bạch hầu hàng năm đã giảm rõ rệt do hiệu quả của việc tiêm phòng vắc xin bạch hầu cho trẻ em được thực hiện có kết quả ở các nước trong khu vực. Những năm đầu thập kỷ 80 của thế kỷ trước, hàng năm ở đây có trên 13.000 trường hợp bạch hầu, đến năm 1990 giảm xuống 1.130 trường hợp và năm 1994 còn 614 trường hợp.

Ở Việt Nam, thời kỳ chưa thực hiện tiêm vắc xin bạch hầu trong Chương trình tiêm chủng mở rộng thì bệnh bạch hầu thường xảy ra và gây dịch ở hầu hết các tỉnh, đặc biệt là ở các thành phố có mật độ dân cư cao. Bệnh xuất hiện nhiều vào các tháng 8, 9, 10 trong năm. Do thực hiện tốt việc tiêm vắc xin bạch hầu nên tỷ lệ mắc bạch hầu ở Việt Nam đã giảm dần từ 3,95/100.000 dân năm 1985 xuống 0,14/100.000 dân năm 2000.

Phương pháp xét nghiệm vi khuẩn bạch hầu trong nội dung hướng dẫn này bao gồm (1) phương pháp nuôi cấy và (2) phương pháp PCR.

II. Yêu cầu chung

1. Nhân sự

- Có ít nhất 02 cán bộ có chuyên môn phù hợp và đã được đào tạo về các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán vi khuẩn bạch hầu.

- Các cán bộ cần được đào tạo về cách sử dụng trang thiết bị, thực hành an toàn sinh học (ATSH), thực hành vi sinh chuẩn, và đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Các cán bộ PXN được đào tạo sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

- Nhân viên mới sau khi đánh giá có kết quả đạt, cần tiếp tục được giám sát ít nhất 3 - 6 tháng trước khi chính thức được thực hiện xét nghiệm độc lập.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả xét nghiệm là cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học, có kinh nghiệm công tác trong lĩnh vực xét nghiệm từ 3 năm trở lên.

- Cán bộ PXN được kiểm tra sức khỏe định kỳ tối thiểu 1 lần hàng năm và được tiêm phòng bạch hầu.

2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị

2.1. Cơ sở vật chất

- PXN cần đáp ứng về điều kiện ATSH, hệ thống quản lý chất lượng PXN theo quy định hiện hành. Các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán vi khuẩn bạch hầu được áp dụng cho phòng xét nghiệm ATSH cấp II trở lên.

- Đối với xét nghiệm PCR cần các khu vực riêng: khu vực pha dung dịch phản ứng (1), khu vực tách chiết DNA (2), khu vực đặt máy PCR (3) và khu vực điện di (4). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) → (2) → (3) → (4).

2.2. Trang thiết bị

Bảng 1. Trang thiết bị

Tên thiết bị	Nuôi cấy	Định danh máy tự động	PCR
Tủ ATSH phù hợp	1 cái		1 cái
Tủ ấm	1 cái		
Nồi hấp ướ	1 cái		
Kính hiển vi	1 cái		
Máy đo độ đục		1 cái	
Hệ thống định danh vi khuẩn tự động		1 bộ	

Tên thiết bị	Nuôi cấy	Định danh máy tự động	PCR
Máy ly tâm nhỏ để bàn			1 cái
Máy ly tâm lạnh			1 cái
Máy vortex	1 cái		1 cái
Máy ủ nhiệt khô			1 cái
Giá tích lạnh			2 cái
Tủ thao tác sạch			1 cái
Máy PCR			1 cái
Hệ thống điện di			1 bộ
Lò vi sóng			1 cái
Tủ lạnh 2°C-8°C	1 cái		1 cái
Tủ âm -20°C hoặc thấp hơn			1 cái
Tủ âm -70°C hoặc thấp hơn	1 cái		1 cái
Pipet 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	1 bộ	1 bộ	3 bộ

- Hồ sơ thiết bị gồm: hồ sơ lắp đặt thiết bị, lý lịch thiết bị, hướng dẫn sử dụng, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Hồ sơ đào tạo sử dụng trang thiết bị cho các nhân viên vận hành thiết bị.

3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm

3.1. Trước xét nghiệm

3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu

- Loại mẫu: dịch ngoáy họng, tổn thương da, niêm mạc.

- Điều kiện bảo quản: Nếu sau 4 giờ không có điều kiện cấy vào môi trường nuôi cấy phân lập thì cần bảo quản trong môi trường Stuart Amies (ở 4°C - 8°C trong vòng 72 giờ, nếu trên 72 giờ cần bảo quản ở nhiệt độ -70°C). Việc bảo quản trong quá trình vận chuyển theo quy định và theo hướng dẫn hiện hành.

- Tiêu chuẩn chấp nhận: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, đủ lượng mẫu, kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hoặc phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Tiêu chuẩn từ chối:

- Mẫu bị vỡ, mẫu không quản quản đúng qui định, bị nhiễm nấm mốc

- Bị bất hoạt do nhiệt, bị trộn lẫn, bị tán huyết mạnh, bị nhiễm khuẩn.

- Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.2 về hủy mẫu tại hướng dẫn này.

3.1.2. **Hiệu chuẩn, hiệu chỉnh máy móc/trang thiết bị**

Tất cả các trang thiết bị thực hiện việc hiệu chuẩn, hiệu chỉnh, bảo dưỡng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

3.1.3. **Kiểm tra chất lượng hóa chất sinh phẩm và vật tư tiêu hao**

- Hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định và còn hạn sử dụng.

- Có hồ sơ theo dõi sử dụng sinh phẩm, hóa chất vật tư tiêu hao.

- Cần có hồ sơ đánh giá, kiểm soát chất lượng sinh phẩm, hóa chất.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

- Các loại sinh phẩm khi nhận về đều phải được kiểm tra.

- Quan sát bằng mắt thường xem các lọ hoá chất, sinh phẩm có bất thường không, ví dụ như bột nắp, rò rỉ, vẩn đục, thay đổi màu sắc.

- Kiểm tra mỗi lô sinh phẩm theo bộ mẫu gồm 2 mẫu dương và 1 mẫu âm của tác nhân mà PXN đang thực hiện theo quy trình xét nghiệm.

- Pha chế sinh phẩm phải luôn được đặt trong khay giữ lạnh và cất lại ngay sau khi dùng xong.

- Vật tư hóa chất được quản lý theo đúng theo quy định và đảm bảo sự sẵn có cho việc thực hiện xét nghiệm.

3.2. **Trong xét nghiệm**

3.2.1. **Nội kiểm**

Đối với xét nghiệm nuôi cấy định danh: xét nghiệm chủng chuẩn cùng với mẫu bệnh phẩm trong quá trình nhuộm Gram, nuôi cấy và định danh.

Đối với xét nghiệm PCR: Tiến hành sử dụng mẫu chứng tại mỗi lần chạy PCR và kiểm soát mẫu chứng như sau:

- Chứng âm:

+ Chứng âm phản ứng (NTC): là nước khử ion được cung cấp cùng bộ sinh phẩm, chứng âm phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp PCR.

+ Chứng âm tách chiết (NEC): mẫu tách chiết là nước tinh sạch không chứa nuclease và được tách chiết cùng mẫu bệnh phẩm, phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp PCR.

- Chứng dương: là DNA được tách chiết từ chủng *C. diphtheriae* chuẩn, nuôi cấy hoặc từ chủng hoặc mẫu được xác định mẫu dương tính với vi khuẩn bạch hầu.

3.2.2. **Đánh giá từ bên ngoài**

Tham gia đánh giá từ bên ngoài (ngoại kiểm, liên phòng hoặc PXN tham chiếu) và thực hiện hành động khắc phục khi kết quả không đạt.

3.3. **Sau xét nghiệm**

3.3.1. Bảo quản và lưu trữ mẫu bệnh phẩm

- Trong trường hợp cần thiết, mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được lưu trong tủ lạnh (từ -20°C hoặc thấp hơn).
- Sau khi cất mẫu, nhân viên PXN ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào sổ lưu giữ mẫu.
- Tất cả các mẫu bệnh phẩm được xếp theo thứ tự từng năm và có sổ lưu giữ mẫu và sơ đồ tủ lưu giữ.
- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

3.3.2. Tiêu hủy mẫu bệnh phẩm

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:
 - Mẫu bệnh phẩm bị từ chối (không đạt tiêu chuẩn).
 - Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ.
- Cho bệnh phẩm cần hủy vào túi rác thải y tế, buộc miệng túi. Sử dụng túi nhựa hấp được, không bị rò rỉ, có quy định màu sắc, ký hiệu rõ ràng trên túi để đựng mẫu
- Hấp ướt tại 121°C trong 30 phút.
- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.
- Sau khi hoàn tất, kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt, các thông số trên máy đạt và lấy túi rác thải.
- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.
- Lập biên bản hủy mẫu theo quy định đảm bảo ATSH.

Lưu ý: lò hấp phải được thẩm định định kỳ bằng chỉ thị sinh học và/hoặc chỉ thị hóa học cấp độ phù hợp.

4. Đọc và đánh giá kết quả

- Kết quả cần được kiểm giám sát và đánh giá bởi ít nhất 2 người và phải được lưu dưới dạng văn bản và trong máy tính.
- Phải kiểm tra các kết quả của mẫu chứng thỏa mãn điều kiện (tùy theo phương pháp áp dụng) mới tiến hành đánh giá kết quả trên mẫu bệnh phẩm xét nghiệm.
- Nếu chứng không đạt thì không được đánh giá kết quả xét nghiệm của mẫu bệnh phẩm mà phải thực hiện lại xét nghiệm; cần tiến hành kiểm tra lại quá trình xét nghiệm bắt đầu từ khâu chuẩn bị, tình trạng của mẫu chứng để tìm hiểu rõ nguyên nhân cần khắc phục.
- Có quy định cụ thể cho trả kết quả cho các trường hợp thường quy, kết quả bất thường/ báo động, khẩn, tạm thời và quy trình xử lý khi trả kết quả nhầm, chậm.

5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm

5.1. Lập kế hoạch bố trí thử nghiệm

-Kế hoạch bao gồm: Người chuẩn bị mẫu, người thực hiện, người đánh giá kết quả; tiêu chuẩn đánh giá; thời gian chuẩn bị mẫu, cách thức chuẩn bị mẫu; các bước tiến hành xét nghiệm, báo cáo kết quả; phê duyệt kết quả xét nghiệm.

- Cần xác định từng phương pháp định tính/định lượng hoặc bán định lượng để xác định giá trị sử dụng cho từng phương pháp,

- Đối với mỗi phương pháp xét nghiệm khi bắt đầu được áp dụng tại PXN mà không có bất kỳ sự thay đổi nào về phương pháp và loại mẫu sẽ tiến hành xác định 03 chỉ tiêu kỹ thuật cơ bản: độ chính xác (accuracy), độ đặc hiệu (specificity), độ chụm (precision). Yêu cầu mỗi đợt thẩm định được lặp lại ít nhất 3 lần để tính độ chụm.

- Cỡ mẫu cần phải được tính toán cẩn thận để nghiên cứu thẩm định có độ tin cậy cao và có ý nghĩa thống kê.

5.2. Độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu

- Bố trí thực hiện bộ mẫu đã được xác định kết quả bằng quy trình tiêu chuẩn hoặc kiểm tra lại kết quả bằng chương trình so sánh liên phòng.

- Thực hiện xét nghiệm như đối với các mẫu của bệnh nhân

Bảng 2. Đọc đánh giá xét nghiệm

Kết quả tại PXN	Kết quả của quy trình tiêu chuẩn	
	Dương tính	Âm tính
Dương tính	A	B
Âm tính	C	D

- Tính toán số liệu:

+ Độ chính xác (Accuracy) = $(a+d)/N$

+ Độ đặc hiệu (Specificity) = $d/(c+d)$

+ Độ nhạy (Sensitivity) = $a/(a+b)$

+ Giá trị tiên đoán dương tính (Positive Predictable Value) = $a/(a+c)$

+ Giá trị tiên đoán âm tính (Negative Predictable Value) = $d/(b+d)$

Trong đó: $N = a + b + c + d$ tổng số kết quả xét nghiệm

Phương pháp nuôi cấy/ định danh: Xác định độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng. Sử dụng tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm.

Phương pháp sinh học phân tử: Xác định độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng. Sử dụng tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm.

5.3.Đánh giá kết quả

Dựa vào việc so sánh các kết quả thực hiện so với tiêu chuẩn của quy trình tiêu chuẩn hoặc tiêu chuẩn nội bộ đề ra. Việc xác nhận giá trị sử dụng phương pháp được kết luận là đạt khi:

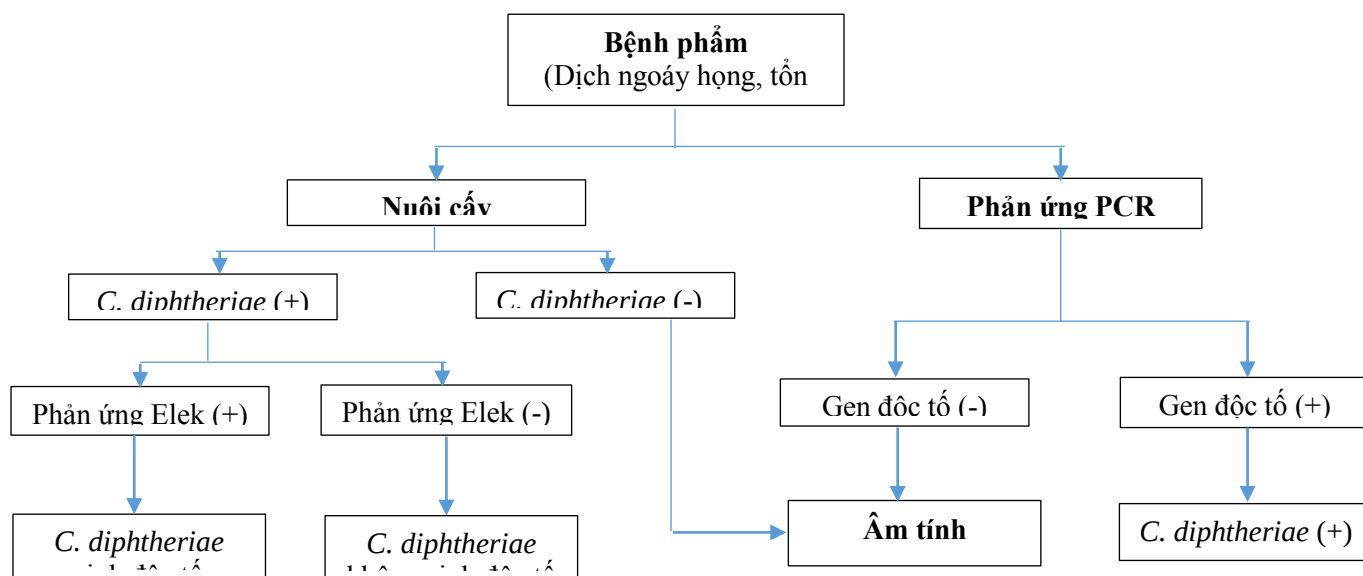
- Độ chính xác, độ đặc hiệu, độ nhạy lớn hơn hoặc bằng giá trị của quy trình tiêu chuẩn.
- Tỷ lệ dương tính giả, âm tính giả nhỏ hơn hoặc bằng giá trị của quy trình tiêu chuẩn.
- Kết quả đánh giá tính chính xác khi hệ số biến thiên $CV < 10\%$.
- Độ chính xác $\geq 90\%$;
- Độ đặc hiệu $\geq 90\%$;
- Độ nhạy $\geq 90\%$;
- Tỷ lệ dương tính giả $\leq 10\%$;
- Tỷ lệ âm tính giả $\leq 10\%$;

5.4.Xem xét định kỳ phương pháp xét nghiệm

- Cần xem xét tính hiệu quả của phương pháp xét nghiệm định kỳ hàng năm thông qua các tiêu chí kỹ thuật: Độ tái lập (tổng hợp từ kết quả kiểm tra chất lượng trong năm), Kết quả tham gia ngoại kiểm, Lỗi hệ thống (áp dụng cho các phương pháp có sử dụng thiết bị). Nếu có yêu cầu thêm về tiêu chí kỹ thuật khác thì phải ghi rõ vào bản báo cáo kết quả. Nếu không có yêu cầu đặt biệt, các tiêu chí kỹ thuật trên có thể bố trí giống như thẩm định phương pháp ban đầu.

- Lưu hồ sơ tất cả các bước thực hiện trên bao gồm các bảng tổng hợp kết quả.

III. Phương pháp xét nghiệm



Ghi chú: +: Dương tính

- : Âm tính

Hình 1. Sơ đồ quy trình xét nghiệm chẩn đoán *C. diphtheriae*

1. Phương pháp nuôi cấy định danh

1.1. Phạm vi áp dụng

Phương pháp nuôi cấy định danh áp dụng đối với mẫu bệnh phẩm dịch ngoáy họng hoặc mẫu tổn thương da, niêm mạc nghi ngờ nhiễm vi khuẩn *C. diphtheriae*. Có thể dùng phương pháp nuôi cấy định danh kiểu cổ điển hoặc phương pháp định danh vi khuẩn *C. diphtheriae* bằng máy định danh tự động Vitek 2 Compact từ khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy. Ngoài ra còn có thể sử dụng các hệ thống định danh khác như Pheonix hoặc MALDI-TOF.

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý nuôi cấy phân lập và định danh: Bệnh phẩm được cấy vào môi trường thạch máu, thạch máu có bổ sung Kali tellurite trong điều kiện hiếu khí ở 37°C tạo điều kiện cho vi khuẩn phát triển tốt. Mục đích là tăng sinh vi khuẩn (nếu có) trong bệnh phẩm, các khuẩn lạc tách biệt được trên môi trường nuôi cấy. Sau đó tiến hành định danh vi khuẩn phân lập được bằng phương pháp định danh thông thường hoặc máy định danh tự động.

Trên nguyên lý này, phương pháp định danh tự động dùng phương pháp đo màu để nhận biết các tính chất sinh vật hoá học của vi sinh vật thông qua sự thay đổi màu của các giếng môi trường có sẵn trong card định danh. Vi khuẩn lên men hay sử dụng các môi trường sinh hóa sẽ làm thay đổi môi trường dẫn đến sinh đổi màu môi trường, gọi là phản ứng dương tính. Vi khuẩn không lên men hay sử dụng môi trường sinh hóa nên không đổi màu môi trường, gọi là phản ứng âm tính. Máy sẽ đo độ hấp thụ của các môi trường sinh hóa âm hoặc dương này ở các bước sóng phù hợp (660nm, 568nm, 428nm), sau đó phần mềm chuyên dụng sẽ phân tích cho kết quả định danh của loài vi khuẩn.

Mẫu xét nghiệm là khuẩn lạc thuần đã được nuôi cấy từ 18 giờ đến 24 giờ.

1.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

1.4. Thực hiện xét nghiệm

1.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Mẫu giả mạc họng: Dùng tăm bông vô trùng ngoáy họng người bệnh, cọ sát nhiều lần vào giả mạc. Nếu không thấy giả mạc thì cọ sát vào chỗ viêm, nhất là hai hạnh nhân.

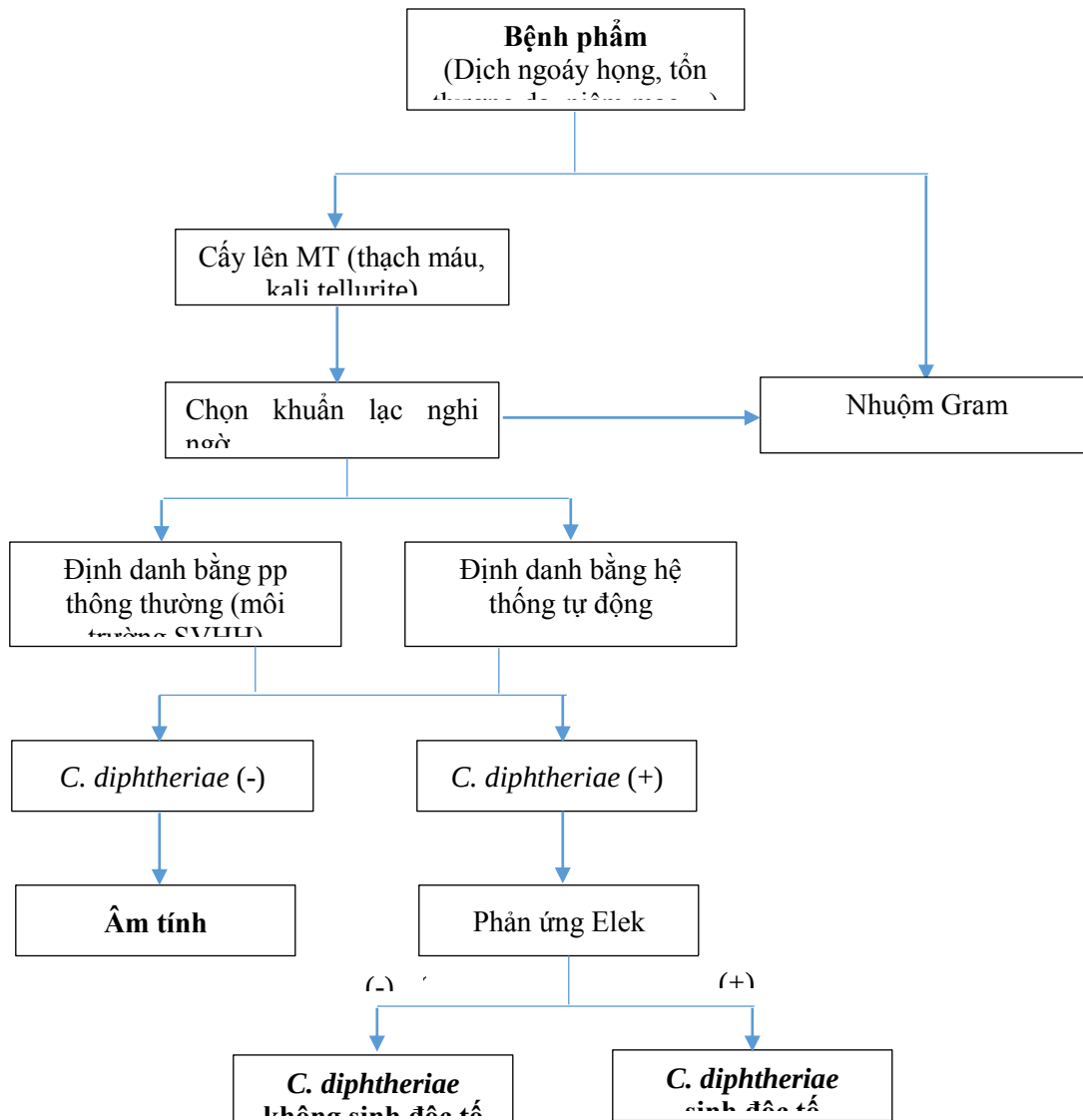
- Bệnh phẩm tổn thương ở da, niêm mạc: Lau vết tổn thương bằng nước muối sinh lý vô trùng rồi dùng tấm bông vô trùng ấn chặt vào vết thương, niêm mạc. Nếu là mẫu mô thì đựng trong ống chứa nước muối sinh lý vô trùng rồi chuyển đến phòng xét nghiệm.

- Điều kiện bảo quản: Bệnh phẩm cần được nuôi cấy càng sớm càng tốt (không nên để quá 3 - 4 giờ). Nếu sau 4 giờ không có điều kiện cấy vào môi trường nuôi cấy phân lập thì cần bảo quản trong môi trường bảo quản.

1.4.2. **Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao**

- Thuốc nhuộm: bộ nhuộm Gram.
- Môi trường vận chuyển Stuart Amies dạng tuýp có que lấy mẫu và môi trường bảo quản.
- Môi trường phân lập: Thạch máu và thạch máu có bổ sung Kali tellurite:
- Môi trường định danh: glucose, maltose, saccharose, urease, nitrate, tinh bột Starch.
- Môi trường thạch Elek.
- Thẻ (Card) định danh ANC của hãng Biomerieux.
- Nước muối vô trùng 0,45%.
- Dung dịch H_2O_2 3%, dung dịch Iodine

1.4.3. **Các bước thực hiện**



Ghi chú: +: Dương tính
 - : Âm tính

Hình 2. Sơ đồ quy trình chẩn đoán *C. diphtheriae* bằng phương pháp nuôi cấy định danh

Bước 1: Cấy bệnh phẩm lên môi trường nuôi cấy và nhuộm Gram.

- Lấy 1 đĩa thạch máu, 1 đĩa thạch Kali tellurite để ở nhiệt độ phòng hoặc hong khô mặt thạch.

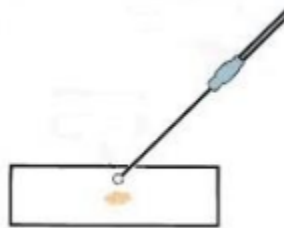
- Ria mẫu tăm bông ngoáy họng vào 2 đĩa thạch trên, ủ trong tủ ấm 37°C/18-24 giờ.



Hình 3. Bệnh phẩm được cấy lên môi trường thạch máu

- Phết tiêu bản nhuộm Gram: Dùng que tăm bông có mẫu bệnh phẩm dàn đều lên giữa lam kính và dàn từ trong ra ngoài tạo một hình tròn đường kính khoảng 1,5cm. Nếu nhuộm Gram từ khuẩn lạc, nhỏ một giọt nước muối sinh lý lên lam rồi dùng que cấy vô trùng mài nhẹ nhàng khuẩn lạc, hòa đều và dàn mỏng với giọt nước muối sinh lý. Để lam mẫu tự khô hoàn toàn.

- Cố định bằng nhiệt: hơ trên ngọn lửa đèn cồn hoặc để lên máy sấy tiêu bản.



Hình 4. Tiêu bản nhuộm Gram

- Tiến hành nhuộm Gram:
- Để tiêu bản lên giá.
- Phủ thuốc nhuộm tím crystal violet lên và để 60 giây.
- Rửa nhẹ nhàng tiêu bản dưới vòi nước sạch cho đến khi không còn màu chảy theo.
- Phủ Lugol để 60 giây.
- Rửa tiêu bản nhẹ nhàng dưới vòi nước sạch.
- Phủ nhanh cồn để khoảng 10 giây.
- Rửa ngay tiêu bản dưới vòi nước sạch.
- Phủ safranin để 60 giây.
- Rửa nhẹ nhàng dưới vòi nước sạch và để tiêu bản khô tự nhiên hoặc trên máy sấy lam.

Lưu ý: Không để vôi nước chảy trực tiếp lên chỗ tiêu bản vừa nhuộm trong quá trình rửa.

- Đọc kết quả nhuộm Gram dưới kính hiển vi ở vật kính dầu 100x.
- Xác định hình thể, kích thước, tính chất bắt màu, cách sắp xếp của vi khuẩn.
- Hình thể vi khuẩn *C. diphtheriae*: trực khuẩn bắt màu tím, hơi cong có khi một đầu nhỏ xếp thành hình chữ V, T, Y hay như hàng rào.



Hình 5. Hình thể vi khuẩn *C. diphtheriae* quan sát dưới kính hiển vi (vật kính 100x)

Lưu ý:

- Trong trường hợp tẩy còn không đúng thời gian, rửa không kỹ sẽ làm sai lệch kết quả.
- Thời gian nuôi cấy ảnh hưởng đến tính chất nhuộm Gram.
- Làm lại xét nghiệm khi có vết nhuộm bắt màu Gram âm hoặc bắt màu không đều, có lẫn cặn hoặc hình dạng tế bào bị biến dạng.

Bước 2: Định danh vi khuẩn bạch hầu:

a. Định danh cổ điển:

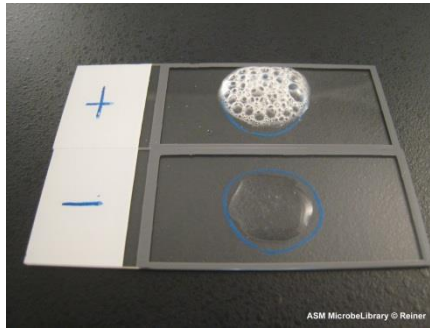
- Sau 24 giờ ủ ở 37°C, chọn khuẩn lạc điển hình để tiến hành nhuộm Gram (như bước 1), quan sát đặc điểm và tính chất bắt màu.

Bảng 4. Đặc điểm khuẩn lạc vi khuẩn *C. diphtheriae* trên các loại môi trường khác nhau

Môi trường	Đặc điểm khuẩn lạc
Thạch máu	Khuẩn lạc bờ đều, tâm cao, màu trắng đục và có vòng tan máu xung quanh khuẩn lạc tùy theo typ
Thạch Kali tellurite	Có màu xám đen hoặc đen
Huyết thanh đông Loeffler	Nhỏ, tròn lồi, bờ đều, màu xám nhạt.

- Cấy chuyển sang môi trường thạch máu, môi trường thạch Kali tellurite khác, môi trường huyết thanh đông.

- Dùng que cấy trích khuẩn lạc từ môi trường thạch cấy lên các loại môi trường: glucose, maltose, saccharose, urease, nitrate
- Phản ứng thủy phân tinh bột (Starch):
- Cấy khuẩn lạc nghi ngờ vào đĩa thạch tinh bột bắp.
- Ủ 37⁰C trong 24 – 48 giờ.
- Phủ dung dịch Iodine lên khuẩn lạc.
- Quan sát ngay phản ứng màu:
 - ✓ Phản ứng âm: thạch tinh bột xung quanh khuẩn lạc đổi màu xanh đậm.
 - ✓ Phản ứng dương: thạch tinh bột xung quanh khuẩn lạc có màu đỏ hay không đổi màu.
- Làm thử nghiệm catalase: Lấy khuẩn lạc 18-24h tuổi đặt lên lam kính sạch. Nhỏ 1 giọt H₂O₂ 3% phủ lên vi khuẩn và quan sát sự tạo thành bọt khí.



Hình 6. Thử nghiệm catalase

b. Định danh vi khuẩn *C. diphtheriae* bằng máy định danh tự động

- Mở máy tính, máy định danh Vitek 2 Compact
- Chuẩn bị card: Lấy card ra khỏi tủ lạnh và để ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút
- Chuẩn bị tuýp làm định danh:
- Ghi nhãn cho tuýp định danh vi khuẩn.
- Lấy 3 ml nước muối 0,45% từ Dispenser vào tuýp định danh.
- Dùng que cấy/tăm bông vô trùng lấy khuẩn lạc nghi ngờ bạch hầu pha vào tuýp định danh trên.
- Kiểm tra độ đục bằng máy đo độ đục, độ đục vi khuẩn nằm trong khoảng 2.7 - 3.3 (McF).
- Cắm tuýp định danh theo thứ tự vào cassette. Đầu hút card định danh được cắm vào các tuýp tương ứng.
- Mở cửa buồng hút, cho cassette vào rồi đóng cửa buồng hút và nhấn Start Fill. Khi đèn báo nhấp nháy (sau khoảng 2 phút), màn hình báo “Transfer”, mở

cửa buồng hút lấy cassette ra và mở cửa buồng vận hành rồi cho cassette chứa card vào (bước này không được quá 10 phút). Đóng cả hai cửa.

- Nhập thông tin cassette và thông tin bệnh nhân vào máy tính.

Lưu ý: Không được mở cửa trước khi mở buồng hút để tránh làm hỏng tất cả các card đang chạy trong máy. Kết quả sẽ được phiên giải bằng phần mềm của máy định danh tự động Vitek 2 Compact và được chấp nhận khi xác suất >85%.

Bước 3. Tìm độc lực: Để kết luận là vi khuẩn bạch hầu có độc tố gây bệnh thì phải tìm độc lực bằng phản ứng Elek.

- Trong đĩa thạch đặt một miếng giấy lọc vô khuẩn 1,5 x 6 cm, dùng pi pét vô khuẩn lấy kháng huyết thanh bạch hầu nhỏ vào giấy thấm 0,20 ml - 0,25 ml (kháng huyết thanh có nồng độ 1000 đơn vị/1ml).

- Đặt vào tủ ẩm 37°C, hong khô trong 1-2 giờ. Sau đó, đổ 1 lớp thạch Elek mỏng phủ lên các miếng giấy thấm kháng huyết thanh (chú ý thạch đun đã để nguội 40°C – 50°C), trong trường hợp nếu không có thạch Elek có thể dùng thạch thường 2,5% để thay thế.

- Khi môi trường đã khô hẳn, cấy các chủng vi khuẩn thử nghiệm theo các đường cấy thẳng góc với miếng giấy.

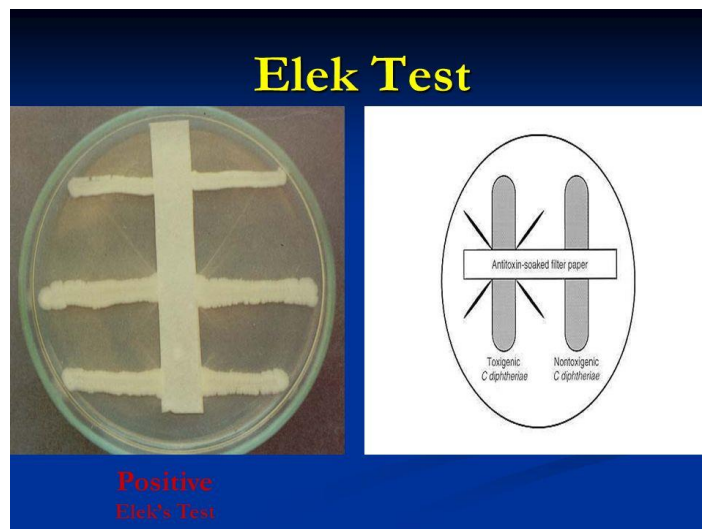
- Mỗi đĩa thạch có thể cấy được 5-6 chủng vi khuẩn. Ủ ẩm 37°C từ 48-72 giờ.

- Kết quả:

- Nếu là vi khuẩn bạch hầu có độc tố sẽ gây nên hiện tượng kết tủa (giữa độc tố và kháng huyết thanh), tạo nên những đường trắng đục gần miếng giấy.

- Cần làm đối chứng với chủng bạch hầu gây bệnh có độc tố để so sánh.

Lưu ý: Các chủng bạch hầu gây bệnh mới phân lập thường cho kết quả rõ rệt.



Hình 7. Phản ứng Elek

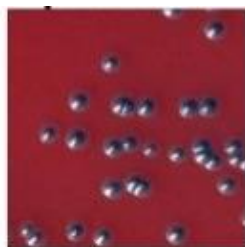
1.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

1.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

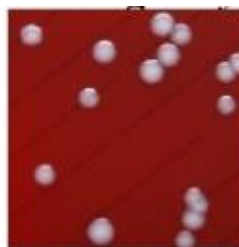
- Tính chất khuẩn lạc của các týp sinh học bạch hầu sau 24 giờ nuôi cấy trên môi trường thạch máu:
 - Týp *C. diphtheriae gravis* có khuẩn lạc lớn, dẹt, màu xám, bề mặt đục mờ
 - Týp *C. diphtheriae mitis* và *C. diphtheriae belfanti* khuẩn lạc nhỏ hơn, thẩm hơn, lồi, bề mặt bóng láng.
 - Týp *C. diphtheriae intermedius* kích thước khuẩn lạc nhỏ nhất, bề mặt bóng láng hoặc xù xì.



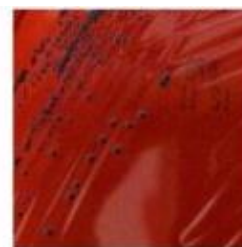
Belfanti



Mitis



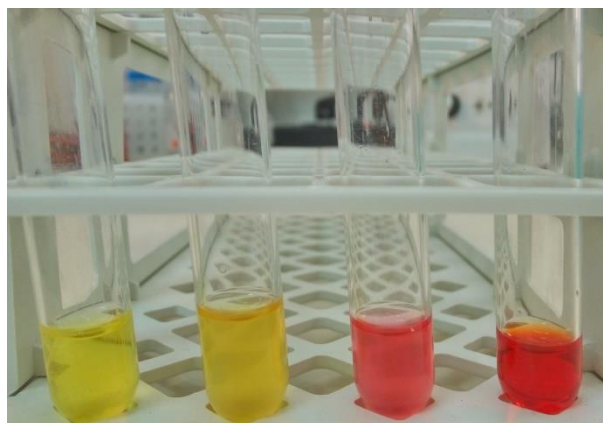
Gravis



Intermedius

Hình 8. Hình thái khuẩn lạc một số týp *C. diphtheriae*

- Trên môi trường chọn lọc Kali tellurite, sau 48 giờ mới thấy nhiều khuẩn lạc có màu xám đen, dùng que cấy đẩy khuẩn lạc sẽ trượt.
- Kết quả thử nghiệm catalase: Bọt khí sủi mạnh và nhanh là dương tính. Không có bọt khí là âm tính. Một số vi khuẩn không có catalase nhưng có khả năng phân hủy H_2O_2 tạo thành bọt khí nhỏ và chậm 30 giây vẫn đọc là âm tính.
- Thử nghiệm lên men các loại đường glucose, saccharose, maltose: Môi trường chuyển từ màu đỏ sang màu vàng là dương tính. Môi trường giữ nguyên màu đỏ là âm tính.
- Thử nghiệm urease: Môi trường chuyển từ màu đỏ sang maug hồng cánh sen là dương tính. Môi trường giữ nguyên màu đỏ là âm tính.



Glucose Maltose Saccharose Urea

Hình 9. Kết quả một số tính chất SVHH của *C. diphtheriae*
1.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

Bảng 5 : Tính chất sinh vật hóa học của một số loài thuộc họ *Corynebacterium*

Vi khuẩn	Glucose	Saccharose	Maltose	Starch	Nitrate	Urease	Catalase	Tan máu
<i>C. diphtheriae gravis</i>	+	-	+	+	+	Âm tính	Dương tính	Có hoặc không
<i>C. diphtheriae intermedius</i>	+	-	+	-	+	Âm tính	Dương tính	Không
<i>C. diphtheriae mitis</i>	+	-	+	-	+	Âm tính	Dương tính	Tan máu β
<i>C. diphtheriae belfanti</i>	+	-	+	-	-	Âm tính	Dương tính	Tan máu β
<i>C. hemolyticum</i>	+	+		+		Âm tính	Âm tính	Không
<i>C. ulcerans</i>	+	-	+	+	-	Dương tính	Dương tính	Không
<i>Corynebacterium hoffmani</i>	-	-		-		Dương tính	Dương tính	Không
<i>Corynebacterium xerosis</i>	+	+		-		-	+	Không
<i>C.pseudotuberculosis</i>	+	-	+	+	-	Dương tính	Dương tính	Không

Ghi chú: + : Lên men - : Không lên men

- Nếu định danh bằng hệ thống Vitek 2, kết quả được chấp nhận khi xác suất >85%.
- Nếu vi khuẩn *Corynebacterium diphtheriae* có phản ứng Elek dương tính thì kết luận *Corynebacterium diphtheriae* sinh độc tố.
- Nếu vi khuẩn *Corynebacterium diphtheriae* có phản ứng Elek âm tính thì kết luận *Corynebacterium diphtheriae* không sinh độc tố.
- Mẫu âm tính khi không phân lập, định danh được vi khuẩn có các đặc điểm trên.
- Mẫu nghi ngờ *Corynebacterium diphtheriae* khi không có đầy đủ các tính chất sinh hóa như trên hoặc kết quả định danh của máy Vitek2 có xác suất < 85%. Khi đó cần tiến hành xét nghiệm lại để kiểm tra.
- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

1.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

2. Phương pháp sinh học phân tử

2.1. Phạm vi áp dụng

Xét nghiệm xác định chẩn đoán vi khuẩn bạch hầu bằng cách phát hiện DNA của vi khuẩn *C. diphtheriae* từ mẫu bệnh phẩm hoặc khuẩn lạc nghi bạch hầu.

Trong phạm vi Hướng dẫn này chỉ trình bày phương pháp PCR cổ điển.

2.2. Nguyên lý

Phản ứng PCR là kỹ thuật sinh học phân tử cổ điển dùng để khuếch đại một trình tự DNA ban đầu thành hàng triệu bản sao. Quy trình PCR cổ điển gồm 3 giai đoạn gồm: biến tính (90°C - 95°C), gắn mồi (40°C - 65°C) và tổng hợp kéo dài (70°C - 75°C) với sự tham gia của DNA polymerase chịu nhiệt, primers và deoxy-nucleotide triphosphates (dNTPs). Quy trình này sử dụng kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện gen mã hóa tiểu phần A và B của độc tố vi khuẩn bạch hầu.

2.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

2.4. Thực hiện xét nghiệm

2.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là dịch ngoáy họng, mẫu tổn thương da, niêm mạc hoặc khuẩn lạc đã được nuôi cấy từ bệnh phẩm của bệnh nhân nghi bạch hầu.
- Tách chiết DNA:
- Chứng âm là nước sử dụng cho sinh học phân tử không chứa DNA (NFW: nuclease free water). Tiến hành tách chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác

- Tách chiết DNA bằng nhiệt (Áp dụng đối với chủng vi khuẩn).
- Lấy 4-5 khuẩn lạc trộn đều với 1 ml nước cất vô trùng.
- Ly tâm 5000 vòng/5phút, 4°C . Loại bỏ dịch nổi.
- Hòa cạn với 1ml dung dịch TE. Đun cách thủy ở 100°C trong 15-30 phút.
- Ly tâm 5.000 vòng/5phút lấy nước nổi làm khuôn mẫu DNA.
- Tách chiết DNA bằng hóa chất (Áp dụng đối với chủng vi khuẩn, dịch ngoáy họng, tổn thương da, niêm mạc...)
- Hút 200 µl mẫu cho vào tuýp 1,5 ml.
- Thêm 20 µl QIAGEN Protease K vào tuýp trên, trộn đều.
- Thêm 200 µl đệm AL cho vào mẫu, vortex 15 giây.
- Ủ ở 56°C trong 10 phút.
- Ly tâm ngắn 5000 vòng/ phút trong 1 phút để kéo những giọt mẫu còn trên nắp tuýp.
- Thêm 200 µl Ethanol (96-100%) vào mẫu, trộn lẫn nữa 15 giây. Ly tâm ngắn 5000 vòng/phút trong 1 phút để kéo những giọt mẫu còn trên nắp tuýp.
- Lấy hỗn hợp từ bước trên sang tuýp 2 ml QIA amp Mini. Đóng nắp, quay ly tâm 8000 vòng/ phút trong 1phút. Thay phần tuýp góp (collection tuýp) chứa dịch lọc bằng một tuýp góp mới. Đóng cột ly tâm (spin column) để tránh việc hình thành khí dung trong quá trình ly tâm.
- Thêm 500 µl buffer AW1. Đóng nắp, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút. Đặt cột lọc sang một tuýp góp sạch khác. Loại bỏ tuýp chứa nước lọc.
- Mở nắp cột lọc, bổ sung 500 µl buffer AW2. Ly tâm 14000 vòng/phút trong 3 phút.
- Loại bỏ tuýp chứa nước lọc, đặt cột lọc vào tuýp 1,5 ml khác. Ly tâm 14000 vòng/phút trong 1 phút.
- Đặt cột lọc vào tuýp 1,5 ml. Loại bỏ tuýp chứa nước lọc. Mở nắp cột lọc, thêm 200 µl buffer AE (hoặc nước sử dụng cho sinh học phân tử). Ủ ở nhiệt độ phòng 1 phút. Ly tâm 8000 vòng/phút trong 1phút. Loại bỏ cột lọc, sử dụng nước lọc thu được làm DNA mẫu cho phản ứng PCR.

2.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

a. Sinh phẩm, hóa chất

- Hóa chất cho phản ứng PCR và điện di:
- Master mix.
- Nước sử dụng cho sinh học phân tử.
- Ultrapure Agarose .
- Dung dịch đệm TAE 10X/1X.
- 100 bp DNA ladder.
- Gel red™ Nucleic acid.
- Kit tách chiết DNA của Qiagene: QIAamp DNA Mini Kit (code: 51304).

- Hai cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR.

Bảng 7: Trình tự mồi dùng cho phản ứng PCR *C. diphtheriae*

Gen đích	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Tài liệu tham khảo
Gen mã hóa tiểu phần A độc tố bạch hầu	Tox 1:	ATCCACTTTTGTGCGAGAACCTTCGTCA	Hiroshi Nakao (1997)
	Tox 2:	GAAAACTTTTCTTCGTACCACGGGACTAA	
Gen mã hóa tiểu phần B độc tố bạch hầu	Dipht 6F:	ATACTTCCTGGTATCGGTAGC	Hiroshi Nakao (1997)
	Dipht 6R:	CGAATCTTCAACAGTGTTCCTCA	

- Kít tách chiết DNA của Qiagene: QIAamp DNA Mini Kit (code:51304)

b. Vật tư tiêu hao

- Bút đánh dấu.
- Tube Eppendorf loại 1.5ml đã khử trùng và không chứa Rnase
- Đầu côn loại 2-50 µl, 20-200 µl, 1000 µl có màng lọc.
- Tube định danh loại 5ml
- Găng tay (không bột), khẩu trang, mũ dùng 1 lần.

2.4.3. Các bước thực hiện

Bước 1. Pha sinh phẩm/hóa chất xét nghiệm bạch hầu

- Đánh dấu tuýp 1,5ml dùng để trộn sinh phẩm.
- Chuẩn bị tuýp hoặc strip PCR 0,2 ml, đánh dấu mã bệnh phẩm và đặt vào giá tích lạnh hoặc trong khay đá trong quá trình chuẩn bị dung dịch phản ứng.
- Xác định số lượng phản ứng (N) cần làm:
- Nếu số mẫu, chứng âm và chứng dương (n) < 14 thì: N=n+1.
- Nếu số mẫu, chứng âm và chứng dương (n) > 14 thì: N=n+2.
- Thể tích từng thành phần cần hút để pha dung dịch phản ứng như sau:

Bảng 8: Thành phần phản ứng multiplex PCR *C. diphtheriae*

Thành phần phản ứng	Nồng độ đầu	Thể tích 1 phản ứng
Master-Mix	2X	25 µl
Tox 1	10µM	1.5 µl
Tox 2	10µM	1.5 µl
Dipht 6F	10µM	1.5µl
Dipht 6R	10µM	1.5 µl

Thành phần phản ứng	Nồng độ đầu	Thể tích 1 phản ứng
Nước sử dụng cho sinh học phân tử	10 μ M	9 μ l
Tổng số		40μl

- Hút các thành phần sinh phẩm bằng pipet (với đầu tip có lọc phù hợp) cho vào tuýp 1,5ml (thực hiện trong tủ thao tác PCR), trộn sinh phẩm nhẹ nhàng bằng pipet, không vortex; ly tâm nhanh khoảng 5 giây và đặt tuýp vào giá tích lạnh.

- Chia dung dịch phản ứng đã trộn vào từng tuýp hoặc strip PCR đã chuẩn bị, đậy nắp.

- Ghi thông tin vào phiếu pha dung dịch phản ứng cho kỹ thuật PCR.

Bước 2. Cho mẫu DNA vào dung dịch phản ứng: Tiến hành trong tủ ATSH.

- Cho 10 μ l DNA mẫu thử vào tuýp hoặc giếng trong strip đúng theo mã số mẫu đã ghi.

- Tương tự, cho DNA chứng dương vào tuýp chứng dương và nước sử dụng cho sinh học phân tử vào tuýp chứng âm. Đóng nắp tuýp/strip ngay sau khi cho mẫu và chuyển sang phòng máy PCR.

Bước 3. Chạy PCR, khuếch đại DNA đích tạo sản phẩm PCR

- Bật máy PCR.

- Ly tâm nhanh các tuýp/strip mẫu khoảng 10 giây rồi đặt vào máy PCR, đậy nắp máy.

- Chọn chương trình chạy máy theo yêu cầu xét nghiệm và cho chạy máy.

Bảng 9. Chu trình nhiệt cho phản ứng Multiplex PCR *C. diphtheriae*

Các bước	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	95 ⁰ C	2 phút	1
Biến tính	95 ⁰ C	30s	35
Gắn mồi	55 ⁰ C	30s	
Tổng hợp	72 ⁰ C	1 phút	
Kết thúc	72 ⁰ C	10 phút	1
Giữ ở nhiệt độ 4 ⁰ C			

- Kết thúc chương trình chạy, mở nắp, lấy tuýp/strip sản phẩm PCR ra để điện di, tắt máy.

- Ghi nhật ký sử dụng thiết bị.

Bước 4. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị gel:
 - Cân 2g agarose bột cho vào chai Duran có 100 ml TAE 1X. Đun agarose bằng lò vi sóng trong khoảng 3-4 phút để agarose tan hoàn toàn.
 - Để dung dịch agarose nguội xuống 50-60°C rồi cho 5 µl GelRed™, lắc nhẹ để trộn đều, đổ dung dịch agarose này vào khuôn đổ thạch có cài sẵn răng lược (tránh không tạo bọt khí khi đổ). Để nguội ở nhiệt độ phòng cho đến khi thạch đông lại, gỡ nhẹ nhàng răng lược ra.
- Điện di:
 - Ly tâm nhanh các tuýp/strip sản phẩm PCR khoảng 10 giây để tập trung sản phẩm PCR xuống đáy tuýp.
 - Đặt khuôn thạch vào bể điện di theo đúng chiều dòng điện từ âm (đen) sang dương (đỏ). Cho dung dịch TAE 1X vào ngập bản thạch sao cho dung dịch đậm cách mặt thạch từ 1-2 mm.
 - Hút 8 µl mỗi sản phẩm PCR trộn đều với 2 µl loading dye, sau đó nhỏ từ từ cho vào các giếng của bản thạch (gồm mẫu thử, mẫu chứng dương và chứng âm).
 - Cho 6 µl thang chuẩn DNA 100 bp vào giếng.
 - Đóng nắp bể điện di, kết nối điện cực của bể điện di với máy chỉnh nguồn điện, chọn hiệu điện thế 100V và thời gian 30 phút.

Bước 5. Soi và chụp ảnh thạch điện di

- Bật máy chụp ảnh gel. Đặt bản thạch ngay ngắn trên bàn đặt gel, bật đèn cực tím để đọc kết quả điện di sản phẩm PCR và chụp ảnh. Kết quả hiển thị trên màn hình của máy đọc gel.
- Đánh mã số cho giếng chứng dương, chứng âm và các mẫu bệnh phẩm tương ứng với các giếng, lưu và in kết quả.
- Ghi nhật ký sử dụng thiết bị.

2.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

2.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Chứng dương: có vạch đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế: Mối Tox1-Tox2: **248 bp**, Diph1 6F-Diph1 6R: **297 bp**
- Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): không có vạch đặc hiệu.
- Mẫu âm tính: khi không có vạch của sản phẩm PCR hoặc xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu.
- Mẫu dương tính: khi mẫu xét nghiệm xuất hiện 1 hoặc cả 2 vạch có kích thước tương ứng với các vạch chứng dương *Tox* và *Diph*.

2.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Trong trường hợp chứng âm phản ứng dương tính mà chứng âm tách chiết âm tính thì làm lại từ khâu pha mix, nếu chứng âm phản ứng âm tính mà chứng âm tách chiết dương tính thì làm lại từ khâu tách chiết.

- Kết quả không cho kết quả rõ ràng hoặc trong trường hợp cần khẳng định chính xác kết quả, PXN có thể yêu cầu lấy lại bệnh phẩm và xét nghiệm theo thường quy.

- Trường hợp sản phẩm PCR của mẫu xét nghiệm xuất hiện vạch mờ tại vị trí đặc hiệu hoặc nghi ngờ sự có mặt của vi khuẩn, có thể làm lại phản ứng PCR với thể tích mẫu DNA tăng lên 12 μ l để xác định kết quả.

- Kết quả được kết luận là dương tính nếu:

- Mẫu chứng âm có kết quả âm tính.

- Mẫu chứng dương có kết quả dương tính.

- Mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính.

- Kết quả được kết luận là âm tính nếu:

- Mẫu chứng âm có kết quả âm tính.

- Mẫu chứng dương có kết quả dương tính.

- Mẫu bệnh phẩm có kết quả âm tính.

- Kết quả không được phép kết luận nếu:

- Mẫu chứng âm có kết quả dương tính (nhiễm).

- Mẫu chứng dương có kết quả âm tính.

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

2.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán bạch hầu bằng phương pháp PCR.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

IV. Tài liệu tham khảo

1. Hướng dẫn sử dụng máy định danh và làm kháng sinh đồ tự động Vitek 2 – compact, 2007.
2. Field guide for preparedness and response to diphtheria outbreak in the Western Pacific, 2018, WHO.
3. Hiroshi Nakao and Tanja Popovic, 1997. Development of a direct PCR assay for detection of the Diphtheria toxin gene, Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 35, No. 7, p. 1651–1655.
4. J. Stephen Thompson, Darlene R. Gates-Davis and David C. T. Yong, 1983. Rapid microbiological identification of *Corynebacterium diphtheriae* and other medically important *Corynebacteria*. Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 18, No. 4, p. 926-929.

5. Manual for the laboratory diagnosis of Diphtheria, 1994, WHO.
6. Surveillance manual, 5th Edition, Chapter 1: Diphtheria, 2011, CDC.

BỆNH TIÊU CHẢY CẤP DO VI RÚT ROTA (ROTAVIRUS)

Bệnh truyền nhiễm thuộc nhóm B trong Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm

I. Mô tả chung

Tiêu chảy là nguyên nhân phổ biến thứ hai gây tử vong ở trẻ em trên toàn thế giới, là bệnh có tỷ lệ mắc và tỷ lệ tử vong cao. Theo thống kê của WHO, hàng năm trên thế giới có khoảng 1,5 tỷ lượt trẻ dưới 5 tuổi mắc tiêu chảy và 4 triệu trẻ chết vì bệnh này. Đây cũng là nguyên nhân của 2,4 triệu ca nhập viện ở trẻ em dưới 5 tuổi hàng năm trên toàn thế giới. Có nhiều tác nhân khác nhau gây tiêu chảy ở trẻ em, bao gồm vi rút, vi khuẩn, ký sinh trùng.

Bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Rota (Rotavirus) là nguyên nhân chính gây tiêu chảy do vi rút, chiếm 39% số ca nhập viện trên toàn thế giới, và tại Châu Á, số ca nhập viện do nhiễm vi rút Rota là 45%. Theo WHO, mỗi năm có khoảng 111 triệu trường hợp mắc bệnh và có khoảng hơn 500.000 trường hợp tử vong. Cũng như các nước đang phát triển, ở Việt Nam, tiêu chảy cấp là nguyên nhân mắc bệnh phổ biến thứ hai ở trẻ em dưới 5 tuổi. Theo chương trình phòng chống tiêu chảy quốc gia, trẻ em nước ta mắc trung bình 3 đợt tiêu chảy/1trẻ/1 năm. Vi rút Rota, thuộc họ *Reoviridae*, vi rút này có 7 nhóm chính xếp từ A đến G. Nhưng gây bệnh cho người thường là các vi rút thuộc nhóm A, ít gây bệnh hơn là nhóm B và C.

Phương pháp xét nghiệm vi rút Rota trong nội dung hướng dẫn này bao gồm: (1) Phương pháp xét nghiệm nhanh vi rút Rota; (2) Xác định vi rút Rota bằng phương pháp ELISA; (3) Xác định vi rút Rota bằng phương pháp RT-PCR.

II. Yêu cầu chung

1. Nhân sự

- Có ít nhất 02 cán bộ có chuyên môn phù hợp và đã được đào tạo về các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán vi rút Rota.

- Các cán bộ cần được đào tạo về cách sử dụng trang thiết bị, thực hành an toàn sinh học (ATSH), thực hành vi sinh chuẩn, và đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Các cán bộ PXN được đào tạo sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

- Nhân viên mới sau khi đánh giá có kết quả đạt, cần tiếp tục được giám sát ít nhất 3 - 6 tháng trước khi chính thức được thực hiện xét nghiệm độc lập.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả xét nghiệm là cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học, có kinh nghiệm công tác trong lĩnh vực xét nghiệm từ 3 năm trở lên.

- Cán bộ PXN được kiểm tra sức khỏe định kỳ tối thiểu 1 lần hàng năm.

2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị

2.1. Cơ sở vật chất

- PXN cần đáp ứng về điều kiện ATSH, hệ thống quản lý chất lượng PXN theo quy định hiện hành. Các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán vi rút Rota được áp dụng tại PXN ATSH cấp II trở lên.

- Đối với xét nghiệm PCR cần 4 khu vực riêng: khu vực pha dung dịch phản ứng (1), khu vực tách chiết DNA (2), khu vực đặt máy PCR (3) và khu vực điện di (4). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) → (2) → (3) → (4).

2.2. Trang thiết bị

Bảng 1: Trang thiết bị

Tên thiết bị	XN nhanh	ELISA	RT-PCR
Máy ly tâm thường	01 cái	01 cái	01 cái
Pi pet (10µl, 100 µl, 1000 µl)	01 bộ	01 bộ	03 bộ
Tủ ATSH phù hợp		01 cái	01 cái
Nồi hấp ướ		01 cái	01 cái
Máy ly tâm thường		02 cái	02 cái
Máy ly tâm lạnh		01 cái	01 cái
Máy vortex			02 cái
Giá tích lạnh			02 cái
Tủ thao tác sạch			01 cái
Máy PCR			01 cái
Máy làm đá vảy			01 cái
Lò vi sóng			01 cái
Hệ thống máy điện di			01 bộ
Tủ lạnh bảo quản sinh phẩm	01 cái		01 cái
Tủ âm -20°C hoặc thấp hơn (bảo quản mẫu)		01 cái	01 cái
Tủ âm -20°C hoặc thấp hơn (bảo quản sinh phẩm)	01 cái	01 cái	01 cái
Tủ âm -70°C hoặc thấp hơn (bảo quản mẫu)		01 cái	01 cái
Cân			01 cái

- Hồ sơ thiết bị gồm: Hồ sơ lắp đặt thiết bị, lý lịch thiết bị, hướng dẫn sử dụng, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Hồ sơ đào tạo sử dụng trang thiết bị cho các nhân viên vận hành thiết bị.

3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm

3.1. Trước xét nghiệm

3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu

- Loại mẫu: Mẫu phân, khoảng 0,5 gram đến 1 gram hoặc 0,5 ml đến 1 ml phân lỏng trong môi trường vận chuyển vi rút (VTM)

- Điều kiện bảo quản:

- + Trong trường hợp không thực hiện xét nghiệm ngay thì cần bảo quản mẫu bệnh phẩm tại nơi lấy mẫu ở 2°C - 8 °C, trong trường hợp bảo quản trên 72 giờ cần bảo quản tại nhiệt độ -70°C. Mẫu bệnh phẩm sau khi được chuyển về PXN, trong trường hợp PXN tiến hành xét nghiệm ngay thì bảo quản 2°C - 8 °C. Nếu PXN chưa xét nghiệm thì bảo quản tại -70°C.

- + Việc bảo quản trong quá trình vận chuyển theo quy định và theo hướng dẫn hiện hành.

- Tiêu chuẩn chấp nhận: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, đủ lượng mẫu, kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hoặc phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Tiêu chuẩn từ chối: Bị bất hoạt do nhiệt, bị trộn lẫn, bị tán huyết mạnh, bị nhiễm khuẩn.

- Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.2 về hủy mẫu tại hướng dẫn này.

3.1.2. Hiệu chuẩn, hiệu chỉnh máy móc/Trang thiết bị

Tất cả các trang thiết bị cần thực hiện việc hiệu chuẩn, hiệu chỉnh, bảo dưỡng theo quy định của nhà sản xuất.

3.1.3. Kiểm tra chất lượng hóa chất sinh phẩm và vật tư tiêu hao

- Hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định và còn hạn sử dụng.

- Có hồ sơ theo dõi sử dụng sinh phẩm, hóa chất vật tư tiêu hao.

- Cần có hồ sơ đánh giá, kiểm soát chất lượng sinh phẩm, hóa chất.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

- Các loạt sinh phẩm khi nhận về đều phải được kiểm tra.

- Quan sát bằng mắt thường xem các lọ hoá chất, sinh phẩm có bất thường không, ví dụ như bột nắp, rò rỉ, vẩn đục, thay đổi màu sắc.

- Kiểm tra mỗi lô sinh phẩm theo bộ mẫu gồm 2 mẫu dương và 1 mẫu âm của tác nhân mà PXN đang thực hiện theo quy trình xét nghiệm.

- Pha chế sinh phẩm phải luôn được đặt trong khay giữ lạnh và cất lại ngay sau khi dùng xong.

- Vật tư hóa chất được quản lý theo đúng theo quy định và đảm bảo sự sẵn có cho việc thực hiện xét nghiệm.

3.2. Trong xét nghiệm

3.2.1. Nội kiểm

Đối với test nhanh: sử dụng chứng nội kiểm trong bộ sinh phẩm (nếu có).

Đối với xét nghiệm ELISA: sử dụng các mẫu chứng theo bộ sinh phẩm và mẫu nội kiểm nếu có.

Đối với xét nghiệm RT-PCR: Tiến hành sử dụng mẫu chứng tại mỗi lần chạy PCR và kiểm soát mẫu chứng như sau:

- Chứng âm:
- Chứng âm phản ứng (NTC): là nước khử ion được cung cấp cùng bộ sinh phẩm, chứng âm phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp PCR.
- Chứng âm tách chiết (NEC): mẫu tách chiết là nước tinh sạch không chứa nuclease và được tách chiết cùng mẫu bệnh phẩm: phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR.
- Chứng dương: là ARN được tách chiết từ chủng nuôi cấy hoặc từ mẫu dương tính với vi rút Rota.

3.2.2. **Đánh giá từ bên ngoài**

Tham gia đánh giá từ bên ngoài (ngoại kiểm, liên phòng hoặc PXN tham chiếu) và thực hiện hành động khắc phục khi kết quả không đạt.

3.3. **Sau xét nghiệm**

3.3.1. **Bảo quản và lưu trữ mẫu bệnh phẩm**

- Trong trường hợp cần thiết, mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được lưu trong tủ lạnh (từ -70°C hoặc thấp hơn).
- Sau khi cất mẫu vào hộp nhân viên PXN ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào sổ lưu giữ mẫu.
- Tất cả các mẫu bệnh phẩm được xếp vào hộp theo thứ tự từng năm và có sổ lưu giữ mẫu và sơ đồ tủ lưu giữ.
- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

3.3.2. **Tiêu hủy bệnh phẩm**

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:
 - Mẫu bệnh phẩm bị từ chối (không đạt tiêu chuẩn).
 - Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ.
- Cho bệnh phẩm cần hủy vào túi rác thải y tế, buộc miệng túi. Sử dụng túi nhựa hấp được, không bị rò rỉ, có quy định màu sắc, ký hiệu rõ ràng trên túi để đựng mẫu
 - Hấp ưót tại 121°C trong 30 phút.
 - Dán băng dính chỉ thị nhiệt.
 - Sau khi hoàn tất, kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt, các thông số trên máy đạt và lấy túi rác thải.
- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.
- Lập biên bản hủy mẫu theo quy định đảm bảo ATSH.

Lưu ý: Lò hấp phải được thẩm định định kỳ bằng chỉ thị sinh học và/hoặc chỉ thị hóa học cấp độ phù hợp.

4. Đọc và đánh giá kết quả

- Kết quả cần được kiểm giám sát và đánh giá bởi ít nhất 2 người và phải được lưu dưới dạng văn bản và trong máy tính.

- Phải kiểm tra các kết quả của mẫu chứng thỏa mãn điều kiện (tùy theo phương pháp áp dụng) mới tiến hành đánh giá kết quả trên mẫu bệnh phẩm xét nghiệm.

- Nếu chứng không đạt thì không được đánh giá kết quả xét nghiệm của mẫu bệnh phẩm mà phải thực hiện lại xét nghiệm; cần tiến hành kiểm tra lại quá trình xét nghiệm bắt đầu từ khâu chuẩn bị, tình trạng của mẫu chứng để tìm hiểu rõ nguyên nhân cần khắc phục.

- Có quy định cụ thể cho trả kết quả cho các trường hợp thường quy, kết quả bất thường/báo động, khẩn, tạm thời và quy trình xử lý khi trả kết quả nhầm, chậm.

5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm

5.1. Lập kế hoạch bố trí thử nghiệm

- Kế hoạch bao gồm: Người chuẩn bị mẫu, người thực hiện, người đánh giá kết quả; tiêu chuẩn đánh giá; thời gian chuẩn bị mẫu, cách thức chuẩn bị mẫu; các bước tiến hành xét nghiệm, báo cáo kết quả; phê duyệt kết quả xét nghiệm.

- Cần xác định từng phương pháp định tính/định lượng hoặc bán định lượng để xác định giá trị sử dụng cho từng phương pháp.

- Đối với mỗi phương pháp xét nghiệm khi bắt đầu được áp dụng tại PXN mà không có bất kỳ sự thay đổi nào về phương pháp và loại mẫu sẽ tiến hành xác định 03 chỉ tiêu kỹ thuật cơ bản: độ chính xác (accuracy), độ đặc hiệu (specificity), độ chụm (precision). Yêu cầu mỗi đợt thẩm định được lặp lại ít nhất 3 lần để tính độ chụm.

- Cỡ mẫu cần phải được tính toán cẩn thận để nghiên cứu thẩm định có độ tin cậy cao và có ý nghĩa thống kê. Đối với xét nghiệm định tính thì làm độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng. Theo CSI tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm. Đối với xét nghiệm định lượng thực hiện độ chính xác, độ nhạy, độ chụm, LOD, giá trị tiên lượng, LOQ, khoảng tuyến tính (nếu có), các thông số ảnh hưởng. Cần tối thiểu 20 điểm dữ liệu. Đối với xét nghiệm bán định lượng thực hiện độ chụm, LOD, độ nhạy, độ đặc hiệu. Chuẩn: tối thiểu 10 chủng; Mẫu thực tế: tối thiểu 20 mẫu

Bảng 2: Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm

Chỉ số	Số lượng mẫu bệnh phẩm /lặp
Độ chính xác	20 mẫu/1
Độ lặp	5 mẫu/nồng độ x 2 nồng độ/1

Chỉ số	Số lượng mẫu bệnh phẩm /lặp
Độ tái lặp	3 lần lặp/mẫu x 3 mẫu/1
Độ nhạy/ độ đặc hiệu	20 mẫu/1

5.2. Độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chụm

- Bố trí thực hiện bộ mẫu đã được xác định kết quả bằng quy trình tiêu chuẩn hoặc kiểm tra lại kết quả bằng chương trình so sánh liên phòng.
- Thực hiện xét nghiệm như đối với các mẫu của bệnh nhân.

Bảng 3: Đọc đánh giá xét nghiệm

Kết quả tại PXN	Kết quả của quy trình tiêu chuẩn	
	Dương tính	Âm tính
Dương tính	a	b
Âm tính	c	d

- Tính toán số liệu:
 - + Độ chính xác (Accuracy) = $(a+d)/N$
 - + Độ đặc hiệu (Specificity) = $d/(c+d)$
 - + Độ nhạy (Sensitivity) = $a/(a+b)$
 - + Giá trị tiên đoán dương tính (Positive Predictable Value) = $a/(a+c)$
 - + Giá trị tiên đoán âm tính (Negative Predictable Value) = $d/(b+d)$
- Trong đó: $N = a + b + c + d$ tổng số kết quả xét nghiệm.
- Độ chụm (gồm độ lặp và độ tái lặp):
 - + Chuẩn bị mẫu có nồng độ xung quang LOD tính toán, lặp lại xét nghiệm 20 lần $LOD = \bar{Y} + 3S$ Trong đó: $\bar{Y}$: kết quả trung bình S: độ lệch chuẩn
 - + Bố trí thực hiện bộ mẫu để kiểm tra tính chính xác gồm 5 mẫu/nồng độ x 2 nồng độ và 3 lần lặp/mẫu x 3 mẫu
 - + Độ lặp: Bộ mẫu được thực hiện lặp lại trong cùng một điều kiện về con người, sinh phẩm và thiết bị.
 - + Độ tái lặp: Bộ mẫu được thực hiện lặp lại trong cùng một điều kiện về sinh phẩm và thiết bị nhưng thay đổi về con người, thời gian.
 - + Thực hiện xét nghiệm như đối với các mẫu của bệnh nhân.
 - + Tính toán số liệu:
 - ✓ Giá trị trung bình (Mean) $\bar{y} = \sum y_i/n$
 - ✓ Độ lệch chuẩn (lặp và tái lặp) (SD) $SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$
 - ✓ Hệ số biến thiên (CV) $CV = (sd/\bar{y}) * 100$

Trong đó: y_i là giá trị thu được trong mỗi lần thực hiện xét nghiệm, n là số lần làm lặp lại.

Phương pháp xét nghiệm nhanh (định tính): làm độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng. Theo CSI tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm

Phương pháp ELISA (bán định lượng) : Đối với xét nghiệm bán định lượng thực hiện độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chụm, giới hạn phát hiện (LOD) tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm

Phương pháp RT-PCR (định tính) : làm độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện (LOD), giá trị tiên lượng. Theo CSI tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm

5.3.Đánh giá kết quả:

- Dựa vào việc so sánh các kết quả thực hiện so với tiêu chuẩn của quy trình tiêu chuẩn hoặc tiêu chuẩn tham chiếu (CLIA) hoặc tiêu chuẩn nội bộ đề ra. Việc xác nhận giá trị sử dụng phương pháp được kết luận là đạt khi:

+ Độ chính xác, độ đặc hiệu, độ nhạy lớn hơn hoặc bằng giá trị của quy trình tiêu chuẩn.

+ Tỷ lệ dương tính giả, âm tính giả nhỏ hơn hoặc bằng giá trị của quy trình tiêu chuẩn.

+ Chấp nhận khi kết quả đạt

✓ Kết quả đánh giá tính chính xác khi hệ số biến thiên $CV < 10\%$.

✓ Độ chính xác $\geq 90\%$;

✓ Độ đặc hiệu $\geq 90\%$;

✓ Độ nhạy $\geq 90\%$;

✓ Tỷ lệ dương tính giả $\leq 10\%$;

✓ Tỷ lệ âm tính giả $\leq 10\%$.

+ Độ chính xác: Đường biểu diễn mối tương quan giữa phương pháp đánh giá và phương pháp tiêu chuẩn phải trùng hoặc gần trùng với đường phân giác. ($a \sim 1$, $b \sim 0$) hoặc giá trị f tính toán phải nhỏ hơn giá trị f tra bảng f -test với cỡ mẫu $n = 20$.

+ Độ chụm: So sánh với độ lệch chuẩn lặp lại do nhà sản xuất cung cấp. Độ lệch chuẩn thực nghiệm cần nhỏ hơn hoặc bằng độ lệch chuẩn công bố hoặc kết quả hệ số biến thiên $CV < 10\%$.

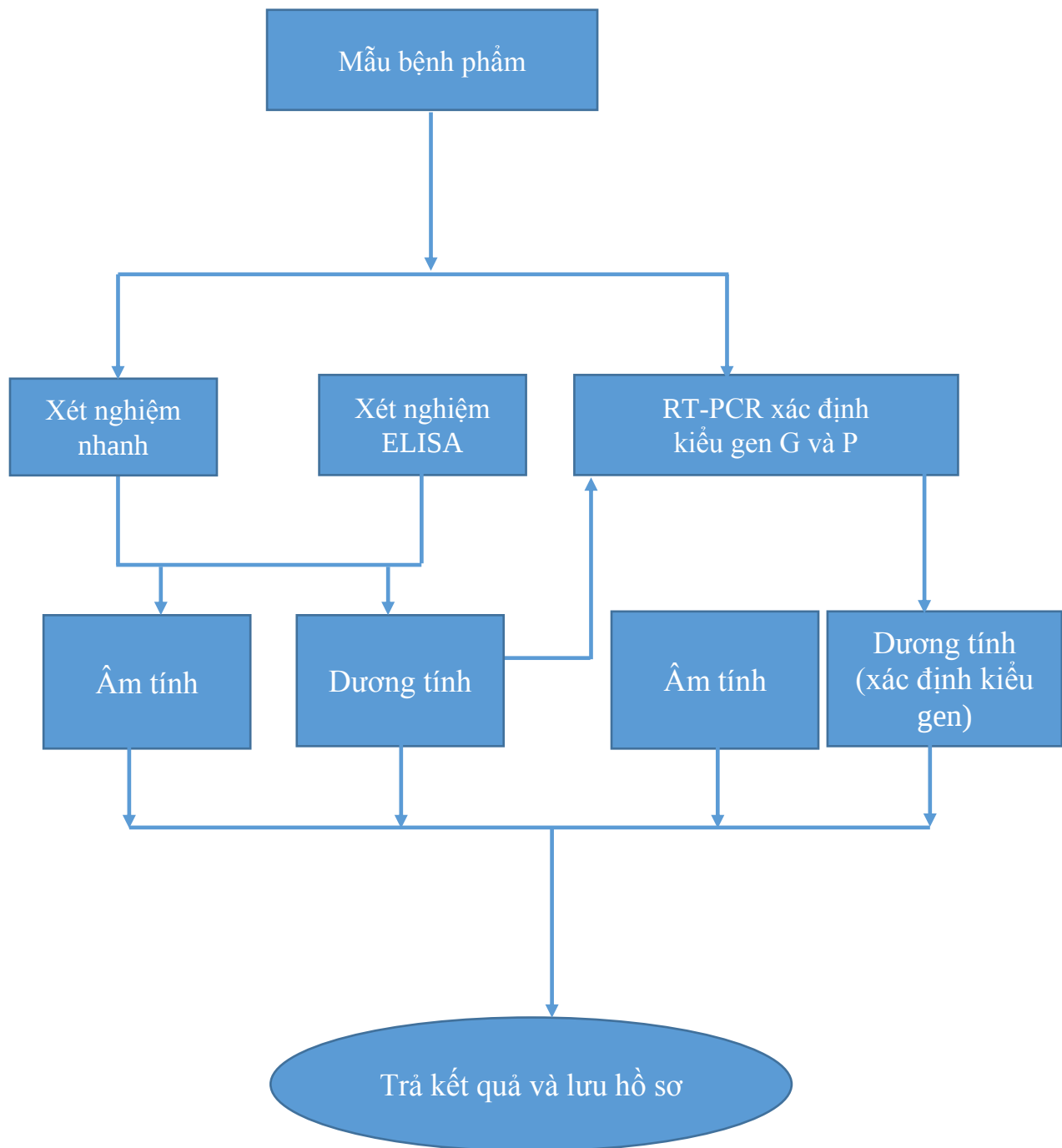
+ LOD, LOQ, khoảng tuyến tính: Công bố ngưỡng phát hiện, ngưỡng định lượng và khoảng tuyến tính thực tế tại phòng xét nghiệm. Đánh giá, nhận xét bằng cách so sánh với thông tin được công bố bởi nhà sản xuất.

5.4.Xem xét định kỳ phương pháp xét nghiệm

- Cần xem xét tính hiệu quả của phương pháp xét nghiệm định kỳ hàng năm thông qua các tiêu chí kỹ thuật: Chính xác, Độ chụm. Nếu có yêu cầu thêm về tiêu chí kỹ thuật khác thì phải ghi rõ vào bản báo cáo kết quả. Nếu không có yêu cầu đặt biệt, 2 tiêu chí kỹ thuật trên có thể bố trí giống như thẩm định phương pháp ban đầu.

- Lưu hồ sơ tất cả các bước thực hiện trên bao gồm các bảng tổng hợp kết quả.

III. Phương pháp xét nghiệm



1. Phương pháp xét nghiệm nhanh

1.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit Rota–Strip được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho phương pháp xét nghiệm nhanh phát hiện kháng nguyên vi rút Rota (VP6) có thể áp dụng cho xét nghiệm sàng lọc trong chẩn đoán và giám sát vi rút tại PXN của các cơ sở y tế đối với mẫu bệnh phẩm lấy trong vòng 5 ngày đầu sau khởi phát.

1.2. Nguyên lý

Test ROTA Strip là một bộ xét nghiệm miễn dịch sắc ký để xác định vi rút Rota nhóm A trong phân người. Que thử này sử dụng một kháng thể đa dòng để phát hiện những nhóm protein xác định bao gồm các protein capsid lớn bên trong (VP6), hiện diện ở vi rút Rota nhóm A.

Lớp màng được bọc kháng thể đa dòng đặc hiệu với rotavirus trên vùng thử nghiệm (test line) của màng. Trong thời gian xét nghiệm, mẫu được phản ứng với cộng hợp keo vàng-một kháng thể cụ thể khác. Hỗn hợp sau đó di chuyển trên màng bằng lực mao dẫn. Đối với kết quả dương tính, sẽ có một vạch nhìn thấy với độ đặc hiệu và độ nhạy cao khi phức hợp kháng nguyên-kháng thể-vàng xuất hiện trên vùng thử nghiệm (test line) của màng. Bất kể sự hiện diện của kháng nguyên vi rút Rota, hỗn hợp liên tục di chuyển trên màng đến vạch kiểm soát (control line) đã được làm khô. Vì thế vạch kiểm soát sẽ luôn xuất hiện và xác định thử nghiệm có hợp lệ hay không.

1.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

1.4. Thực hiện xét nghiệm

1.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu: mẫu phân. Lấy trong thời gian dưới 1 tuần kể từ ngày khởi phát
- Thể tích bệnh phẩm dùng trong xét nghiệm: khoảng 0,5 gram đến 1 gram hoặc 0,5 ml đến 1 ml phân lỏng trong môi trường vận chuyển vi rút (VTM).

1.4.2. Sinh phẩm, hóa chất và vật tư tiêu hao

- Bộ kit Rota–Strip được sử dụng và được bảo quản theo quy định của nhà sản xuất. Bộ kit gồm :
 - Que thử trong túi nhôm với chất hút ẩm.
 - Tuýp đựng mẫu.
 - Dung dịch đệm pha mẫu.
 - Que lấy mẫu.

1.4.3. Các bước thực hiện

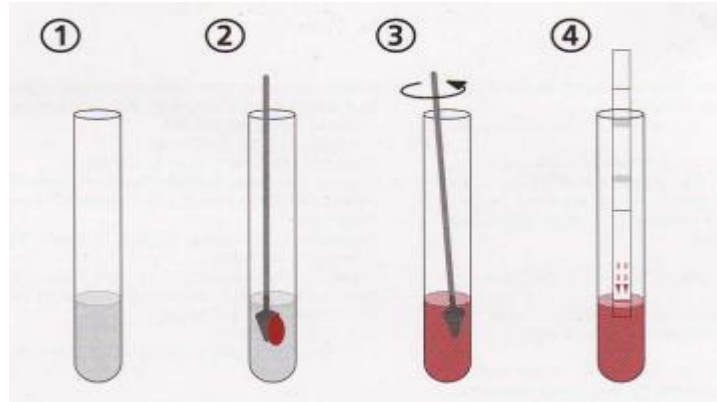
Đề mẫu xét nghiệm và mẫu nội kiểm ở nhiệt độ phòng (trong khoảng 30 phút) trước khi xét nghiệm. Lấy que thử tương ứng với số lượng mẫu cần xét nghiệm, để ổn định ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút.

Bước 1. Cho 0,5 ml dung dịch pha loãng vào mỗi tuýp

Bước 2. Cho khoảng 12,5mg hoặc khoảng 12,5 µl mẫu phân vào tuýp chứa dung dịch pha loãng

Bước 3. Nhúng que thử vào tuýp chứa mẫu theo đúng hướng mũi tên

Bước 4. Bấm đồng hồ 15 phút, đọc kết quả sau 15 phút ± 5 phút.

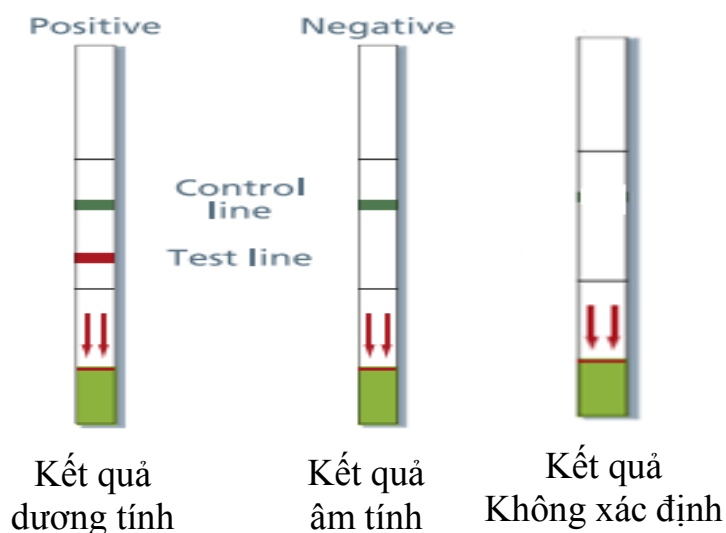


Hình 1. Mô tả các bước tiến hành xét nghiệm

1.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

1.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Cầm que thử theo chiều thẳng đứng phía trước mặt để đọc kết quả.
- Mẫu dương tính: Xuất hiện 2 vạch màu (vạch “T” và “C”) trong khung cho dù vạch nào xuất hiện trước đều cho kết quả dương tính.
- Mẫu âm tính: Chỉ xuất hiện một vạch màu đỏ trong khung (vạch “C”) cho biết kết quả âm tính.
- Mẫu không xác định: không xuất hiện vạch nào: làm lại xét nghiệm



Hình 2: Kết quả xét nghiệm nhanh

1.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Nếu không có vạch nào xuất hiện trong khung sau khi thử nghiệm, kết quả đó coi như là không hợp lệ (Một vài nguyên nhân của sự cố này là không tuân theo đúng chỉ dẫn; Khuyến cáo mẫu này nên được thử nghiệm lại bằng một bộ que thử mới).

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

- Mẫu âm tính: Chỉ xuất hiện một vạch màu đỏ trong khung (vạch “C”) cho biết kết quả âm tính.

- Mẫu dương tính: Xuất hiện 2 vạch màu (vạch “T” và “C”) trong khung cho dù vạch nào xuất hiện trước đều cho kết quả dương tính.

- Mẫu không xác định: không xuất hiện vạch nào

1.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán Rota.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

2. Phương pháp xét nghiệm ELISA

2.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit ELISA ProSpecT Rotavirus Microplate Assay được sử dụng làm ví dụ để tham khảo và được bảo quản theo quy định của nhà sản xuất sử dụng cho phát hiện vi rút Rota có thể được áp dụng cho khẳng định tình trạng nhiễm vi rút Rota tại PXN của các cơ sở y tế.

2.2. Nguyên lý

Bộ sinh phẩm ELISA ProSpecT Rotavirus Microplate Assay sử dụng nguyên lý kỹ thuật miễn dịch gắn enzyme sandwich, tám vi lượng được gắn kháng thể đa dòng phát hiện kháng nguyên đặc hiệu nhóm của các vi rút Rota nhóm A. Dịch nổi mẫu phân và mẫu chứng được cho vào các giếng để ủ cùng lúc với cộng hợp enzyme peroxidaza horseradish. Kháng nguyên vi rút Rota có trong mẫu sẽ được bắt giữ nằm giữa kháng thể trên pha rắn và cộng hợp kháng thể gắn enzyme. Sau khi ủ 60 phút ở nhiệt độ phòng, rửa tám vi lượng bằng dung dịch đệm rửa đã pha ở nồng độ sử dụng để loại bỏ mẫu thừa và kháng thể gắn enzyme không liên kết với phức hợp. Cơ chất được bổ sung vào các giếng và ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sự tạo thành kháng thể gắn enzyme làm đổi màu các giếng thành màu xanh. Phản ứng được dừng lại khi bổ sung axit và dung dịch chuyển sang màu

vàng. Độ đậm màu cao hơn mức nền là chỉ thị cho sự có mặt của kháng nguyên vi rút Rota trong mẫu hoặc chứng.

2.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

2.4. Thực hiện xét nghiệm

2.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu: mẫu phân. Lấy trong thời gian dưới 1 tuần kể từ ngày khởi phát
- Thể tích bệnh phẩm dùng trong xét nghiệm: khoảng 0,5 gram đến 1 gram hoặc 0,5 ml đến 1 ml phân lỏng trong môi trường vận chuyển vi rút (VTM)

2.4.2. Sinh phẩm, hóa chất và vật tư tiêu hao

- Tấm phản ứng (microplate 8 giếng/1 strip) được phủ kháng thể đa dòng đặc hiệu từ thỏ. Túi bạc có dây khóa và hút ẩm dùng để chứa những giếng chưa dùng hết. Các giếng có thể sử dụng sau 16 tuần khi mở lần đầu, nếu được bảo quản tại 2°C - 8°C.

- Cộng hợp enzyme (Enzyme Conjugate) : Một lọ nhỏ giọt chứa 12 ml kháng thể đa dòng kháng đặc hiệu vi rút rota cộng hợp với peroxidaza horseradish trong dung dịch đệm protein chứa kháng sinh và thuốc nhuộm xanh.

- Chứng dương (Control (+)): Một lọ nhỏ giọt chứa 4 ml vi rút rota bất hoạt trong dung dịch có kháng sinh.

- Chứng âm (Control (-)): Một lọ nhỏ giọt chứa 4 ml dung dịch muối đệm tris, kháng sinh và thuốc nhuộm đỏ.

- Dung dịch đệm pha loãng mẫu (Sample Diluent): Một lọ 120 ml dung dịch đệm muối tris, kháng sinh và thuốc nhuộm đỏ.

- Dung dịch đệm rửa (Wash Buffer x10): Một lọ 120 ml đệm photphat đặc 10 lần có kháng sinh và chất tẩy.

- Đệm cơ chất TMB (Substrate TMB): một lọ nhỏ giọt chứa 12 ml 3,3' ; 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) trong đệm.

- Dung dịch dừng phản ứng (Stop Solution): một lọ 12ml chứa 0,46 mol/L axit sulphuric.

- Tuýp nghiệm, đầu tít, giấy thấm...

- Chuẩn bị dung dịch rửa phản ứng:

- Pha loãng 10 lần dung dịch gốc đặc 10X trong nước cất 2 lần, ví dụ 100 ml dung dịch gốc cho vào 900 ml nước cất 2 lần.

- Ghi nhãn bên ngoài gồm những nội dung: Dung dịch rửa phản ứng ELISA 1X, ngày thực hiện pha loãng, người thực hiện.

- Dung dịch rửa đã pha loãng có thể sử dụng trong vòng 30 ngày nếu được bảo quản tại 2°C - 8°C.

- Pha loãng mẫu phân trong dung dịch pha loãng với tỉ lệ 1:10

- Ghi tên mẫu vào từng tuýp và đánh dấu tên mẫu vào tấm phản ứng
- Hút 1.000 µl dung dịch pha loãng vào từng tuýp nhựa
- Hút 100 µl dung dịch phân cho vào tuýp đã có sẵn dung dịch pha loãng (dùng pi pét Pasteur có sẵn trong bộ kit, lấy mẫu đến vạch đầu tiên của pi pét)
- Trộn đều từng tuýp bằng máy trộn và để lại pi pét cho sử dụng tiếp theo.

2.4.3. Các bước thực hiện

Bước 1. Lấy bộ sinh phẩm ra khỏi tủ mát, để bộ sinh phẩm ở ngoài cho đến khi sinh phẩm đạt nhiệt độ PXN (thông thường khoảng 20 phút).

Bước 2. Chuẩn bị sơ đồ mẫu theo Bảng 4

Bảng 4: Sơ đồ mẫu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Chứng dương											
B	Chứng âm											
C	Mẫu A											
D	Mẫu B											
E	Mẫu C											
F	Mẫu D											
G	Mẫu E											
H	Mẫu F											

Ghi chú: Phần ô trống điền thông tin mẫu

Bước 3. Nhỏ mẫu vào giếng phản ứng theo sơ đồ nhỏ mẫu đã được chuẩn bị trình tự nhỏ mẫu như sau:

- Mẫu bệnh phẩm: 100 µl mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng tương ứng.
- Chứng dương: 2 giọt vào Giếng A1.
- Chứng âm: 2 giọt vào Giếng B1

Bước 4. Cho cộng hợp 2 giọt cộng hợp vào mỗi giếng của bản phản ứng.

- Đậy tấm và ủ bản tại nhiệt độ PXN trong vòng 60 ± 5 phút.
- Loại bỏ (bằng phương pháp lắc đổ hoặc hút) dung dịch phản ứng trong các giếng.

Bước 5. Rửa toàn bộ các giếng phản ứng với dung dịch rửa đã pha loãng (1X) bằng cách cho khoảng 350-450 µl dung dịch rửa vào mỗi giếng. Lắc đổ hoặc hút toàn bộ dung dịch rửa sau mỗi bước rửa. Rửa các giếng phản ứng tổng cộng 5 lần. Làm khô bản bằng các vỗ ngược bản gắn các giếng phản ứng trên giấy thấm.

Bước 6. Nhỏ 2 giọt cơ chất vào mỗi giếng phản ứng. Đậy tấm và để ở nhiệt độ PXN trong bóng tối trong 10 ± 1 phút.

Bước 7. Nhỏ 2 giọt dung dịch dùng phản ứng vào mỗi giếng phản ứng. Lắc đều hỗn hợp phản ứng trước khi đọc kết quả. Các sản phẩm đã được chuyển màu sẽ ổn định trong vòng 30 phút sau khi cho dung dịch dùng phản ứng.

Bước 8. Đọc kết quả tại bước sóng chính 450 nm (bước sóng tham chiếu 620 nm đến 650 nm).

2.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

2.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Chứng dương: Có tín hiệu huỳnh quang phù hợp theo hướng dẫn nhà sản xuất hoặc theo quy định của phòng xét nghiệm.

- Chứng âm: Tính giá trị trung bình hấp thu ánh sáng của 2 chứng âm. Nếu 1 trong 2 giếng chứng âm có giá trị $> 0,03$ giếng kia thì loại bỏ giá trị cao hơn.

- Chỉ đọc kết quả khi đáp ứng giá trị OD của chứng âm hoặc giá trị trung bình cộng của các chứng âm phải nhỏ hơn 0,150, và giá trị OD của chứng dương phải lớn hơn 0,500.

- Tính giá trị cut-off = giá trị OD của chứng âm (Negative control) + 0,200, hoặc lấy giá trị trung bình cộng nếu có hơn một chứng âm.

2.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Mẫu được xác định dương tính khi có bước sóng OD $>$ giá trị cut-off.

- Mẫu được xác định âm tính khi có bước sóng OD $<$ giá trị cut-off.

- Mẫu được xác định nghi ngờ khi có OD nằm trong khoảng $\pm 0,010$ của giá trị cut-off (Cut-off value – 0,01 $\leq$ OD mẫu $\leq$ Cut-off value + 0,01).

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

Bảng 5. Nhận định kết quả xét nghiệm

ODChứng dương	ODChứng âm	OD mẫu	Kết quả	Kết luận
Đạt	Đạt	$>$ Cut-off	Dương tính	Dương tính
Đạt	Đạt	$<$ Cut-off	Âm tính	Âm tính
Đạt	Đạt	$\geq$ Cut-off – 0,01 và $\leq$ Cut-off + 0,01	Không xác định	Không xác định
Đạt	Không đạt	Không áp dụng	Không đạt	Làm lại xét nghiệm
Không đạt	Đạt	Không áp dụng	Không đạt	Làm lại xét nghiệm
Không đạt	Không đạt	Không áp dụng	Không đạt	Làm lại xét nghiệm

2.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

3. Phương pháp xét nghiệm RT-PCR

3.1. Phạm vi áp dụng

Phương pháp xét nghiệm này được áp dụng cho việc xác định vi rút Rota nhóm G hoặc P trong mẫu bệnh phẩm phân.

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit Qiagen (QIAamp viral RNA Mini kit và QIAGEN Onestep RT-PCR) được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho xét nghiệm chẩn đoán sinh học phân tử vi rút Rota.

3.2. Nguyên lý

RNA của vi rút Rota được phiên mã ngược thành cDNA. Sau đó cDNA được cho vào tuýp chứa dung dịch phản ứng RT-PCR bao gồm cặp mồi đặc hiệu cho vi rút Rota, enzyme Taq DNA polymerase, dNTPs....nhằm tạo ra các đoạn cDNA và chạy điện di trên thạch agarose để phát hiện sự có mặt hay không của đoạn gen đích đã được khuếch đại.

3.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

3.4. Thực hiện xét nghiệm

3.4.1. Loại bệnh phẩm

- Loại mẫu: Mẫu phân. Lấy trong thời gian dưới 1 tuần kể từ ngày khởi phát.
- Thể tích bệnh phẩm dùng trong xét nghiệm: khoảng 0,5 gram đến 1 gram hoặc 0,5 ml đến 1 ml trong môi trường vận chuyển vi rút.

3.4.2. Sinh phẩm, hóa chất và vật tư tiêu hao

- Bộ kit tách chiết QIAamp viral RNA Mini kit (Qiagen)
- Kit RT-PCR: QIAGEN Onestep RT-PCR (Cat No: 210212)

Bảng 5. Thành phần bộ kit

Thành phần của bộ kit	Thể tích
Đệm PCR 5x	1x1 ml
Đệm Q	1x2 ml
dNTPs	1x200µl
Enzyme mix	1x200µl
Nước cất 2 lần không chứa Nuclease	2x1,9ml

- Bộ mồi

Bảng 6. Thành phần bộ mồi

Tên mồi	Trình tự (5'-3')
VP7F	ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC
VP7R	AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC
VP4F	TAT GCT CCA GTN AAT TGG
VP4R	ATT GCA TTT CTT TCC ATA ATG

- Chuẩn bị đệm AVL :
 - Thêm 310µl buffer AVE vào tuýp đã chứa sẵn 310 µg chất mang ARN (ARN carrier), lắc trộn bằng máy vortex cho tan hoàn toàn.
 - Hút toàn bộ dung dịch này cho vào lọ Buffer AVL 31 ml
 - Lắc đều, phân chia 560 µl ra các tuýp eppendorf 1,5 ml
 - Giữ ở - 20°C cho đến khi sử dụng. Không làm tan băng quá 3 lần.
 - Làm ấm ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- Chuẩn bị đệm AW1:
 - Bổ sung Ethanol (96-100%) vào chai đệm AW1 theo hướng dẫn của kit tách chiết.
 - Đánh dấu trên nắp chai đã thêm ethanol và ghi ngày tháng năm chuẩn bị đệm AW1 trên chai.
 - Bảo quản ở nhiệt độ phòng theo hạn sử dụng của kit tách chiết.
- Chuẩn bị đệm AW2:
 - Bổ sung Ethanol 96 – 100% vào chai AW2 theo hướng dẫn của kit tách chiết.
 - Đánh dấu trên nắp chai đã thêm ethanol và ghi ngày, tháng, năm chuẩn bị đệm AW2 trên chai.
 - Bảo quản ở nhiệt độ phòng theo hạn sử dụng của kit tách chiết.
- Chuẩn bị thạch điện di:
 - Sử dụng dung dịch TBE thương mại hoặc pha dung dịch TBE như bên dưới.
 - Pha dung dịch đệm TBE 10X:
 - +Tris Base: 108 g
 - +Boric acid: 55 g
 - +Nước cất: 600 ml
 - Hòa tan Tris Base và Boric acid trong nước.
 - Thêm EDTA 0.5M, pH8 20 ml.
 - Thêm nước cất cho đủ 1000 ml.

- Kiểm tra pH trong khoảng 8 - 8,3; nếu pH ngoài khoảng này thì phải pha lại, không chỉnh pH bằng hóa chất vì sự thay đổi nồng độ ion sẽ ảnh hưởng đến sự di chuyển của ADN trong bản thạch khi điện di.
- Hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C/ 20 phút.
- Bảo quản ở nhiệt độ phòng.
- Pha dung dịch đệm TBE 1X:
- Khi sử dụng lấy 100 ml TBE 10X pha vào 900 ml nước cất thành dung dịch TBE 1X, bảo quản ở nhiệt độ phòng.
- Nồng độ agarose 2% được pha theo bảng sau:

Bảng 7. Thành phần hóa chất

Nồng độ Agarose	Nồng độ 2%
TBE 1x (ml)	100
Agarose (g)	2
SafeRed10mg/ ml	10,0

- Tách chiết mẫu

Bước 1. Thêm 140 µl mẫu vào 560 µl dung dịch ly giải vi rút AVL có chất mang ARN.

Bước 2. Trộn bằng máy trộn khoảng 15 giây, để tạo một hỗn dịch đồng nhất giữa mẫu và đệm AVL, ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút.

Bước 3. Ly tâm nhanh tuýp hỗn hợp khoảng 10 giây bằng máy ly tâm để tất cả các dung dịch không dính trên nắp tuýp. Thêm 560 µl Ethanol (96-100%) vào mỗi tuýp, trộn đều bằng máy trộn trong 15 giây, Ethanol sẽ tủa các sợi ARN. Ly tâm nhanh khoảng 10 giây.

Bước 4. Cho 630 µl hỗn dịch trên vào cột QIAamp, ly tâm 8.000 vòng trong 1 phút. Tất cả ARN sẽ được gắn trên bề mặt màng Silicagel với sự có mặt của chất mang ARN. Chuyển cột sang tuýp 2 ml mới.

Bước 5. Mở nắp cột QIAamp, lặp lại bước 4.

Bước 6. Mở nắp cột QIAamp, thêm 500 µl đệm AW1. Đóng nắp và ly tâm 8.000 vòng trong 1 phút. Chuyển cột spin sang tuýp 2 ml sạch và loại bỏ tuýp có chứa dịch lọc. AW1 có tác dụng loại bỏ các thành phần không phải là ARN có trên mặt màng Silicagel.

Bước 7. Mở nắp cột QIAamp, thêm 500 µl đệm AW2. Đóng nắp và ly tâm trong khoảng từ 12.000 vòng đến 14.000 vòng trong 3 phút. Chuyển cột QIAamp sang tuýp 2 ml sạch và loại bỏ tuýp có chứa dịch lọc. Tiếp theo, ly tâm thêm 1 phút ở tốc độ từ 12.000 vòng đến 14.000 vòng để loại bỏ hoàn toàn đệm AW2.

Bước 8. Chuyển cột spin QIAamp vào tuýp ly tâm sạch 1,5ml và loại bỏ tuýp chứa dịch lọc cũ.

Bước 9. Mở nắp cột spin QIAamp, thêm 60µl đệm AVE và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm 8000 vòng trong 1 phút để toàn bộ ARN tách khỏi màng Silicagel. Sau khi ly tâm toàn bộ ARN của mẫu sẽ được thu hồi trong dịch lọc.

- Lưu giữ mẫu đã tách chiết ở nhiệt độ -20°C hoặc -70°C.
- ARN sau khi tách chiết được xét nghiệm bằng chạy phản ứng theo phương pháp RT-PCR hoặc realtime RT-PCR
- Chuẩn bị phản ứng RT-PCR:
 - Thao tác được thực hiện tại tủ thao tác PCR phòng chuẩn bị dung dịch phản ứng. Sinh phẩm dùng trong phản ứng RT-PCR: QIAGEN Onestep RT-PCR hoặc tương đương.
 - Xếp các hoá chất, sinh phẩm cần sử dụng lên hộp tích lạnh theo thứ tự trong bảng pha dung dịch phản ứng
 - Đánh dấu tuýp 1,5 ml hoặc tuýp 0,5 ml dùng để trộn sinh phẩm và đặt lên hộp tích lạnh.
 - Xác định số lượng phản ứng (N) cần làm: $N = n + 1$ (nếu $n \leq 14$) hoặc $N = n+2$ (nếu $n > 14$) với n: là tổng số mẫu xét nghiệm cộng với 1 chứng dương ARN, 2 chứng âm).
 - Xác định số lượng mẫu cần xét nghiệm (n) và pha hỗn hợp phản ứng theo bảng sau:

Bảng 8: Thành phần sinh phẩm cần thiết cho xét nghiệm RT-PCR

Sinh phẩm	Thể tích (µl)	Thể tích cho N phản ứng (µl)
Đệm PCR 5x	5 µl	5 x N
Đệm Q	5 µl	5 x N
dNTPs (kit)	1 µl	1 x N
Enzyme mix (kit)	1 µl	1 x N
Mồi xuôi (20 µM)	0,25 µl	0,25 x N
Mồi ngược (20 µM)	0,25 µl	0,25 x N
Nước cất 2 lần không chứa nuclease (Nuclease Free Water)	2,5 µl	2,5 x N
ARN mẫu	5 µl	
Tổng số	20 µl	

3.4.3. Các bước thực hiện

Bước 1. Ghi mã số mẫu vào biểu mẫu kết quả xét nghiệm RT-PCR.

Bước 2. Cho 5 µl mẫu ARN bệnh phẩm vào hỗn hợp sinh phẩm đã chuẩn bị cho phản ứng RT-PCR.

Bước 3. Cho các mẫu chứng vào tuýp tương ứng. Mẫu chứng dương cần được thao tác tại tủ ATSH cấp II.

Bước 4. Khởi động và kiểm tra chương trình trước khi chạy máy PCR theo yêu cầu xét nghiệm.

Bước 5. Đặt các tuýp vào máy PCR và cài đặt thiết bị cho phản ứng RT-PCR.

Bảng 9: Thông số chu trình nhiệt RT-PCR Rota

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp
42	30:00	1
95	15:00	1
94	00:30	35
42	00:30	
72	01:00	
72	7:00	1
4	∞	1

Bước 6. Ghi hồ sơ quá trình thực hiện phản ứng, bao gồm mã thiết bị sử dụng, block sử dụng (nếu có), ngày sử dụng.

Bước 7. Sau khi kết thúc quá trình chạy máy, mang các mẫu sang phòng điện di và tiến hành điện di sản phẩm RT-PCR.

Bước 8. Điện di sản phẩm RT-PCR

- Chuyển sản phẩm PCR vào thạch.
- Đặt thạch vào bể điện di theo đúng chiều dòng điện từ âm sang dương rồi cho TBE 1X ngập bản thạch sao cho dung dịch đệm cách mặt thạch từ 1- 2mm.
- Cho 1 µl đệm đặt mẫu 6X (Loading Dye 6X) vào từng giếng của đĩa microtitre hoặc trên giấy parafilm với số lượng tương ứng với số mẫu cần phân tích.
- Trộn 9 µl mỗi sản phẩm PCR với 1µl đệm đặt mẫu 6X.
- Trộn 4 µl - 5 µl thang chuẩn ADN 100 bp hoặc 1000 bp với 1µl đệm đặt mẫu X6. Chuyển dung dịch đã được trộn với nhau vào trong các giếng của bản thạch.
- Đóng nắp của bể điện di, chọn dòng điện 110V và thời gian 30 phút. Sau thời gian chạy máy điện di 30 phút, tắt máy điện di, chuyển thạch sang máy đọc.
- Soi và chụp ảnh: Đặt bản thạch ngay ngắn trên máy đọc, bật đèn tím để đọc bản thạch và chụp ảnh.

3.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

3.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Chứng dương: có dạng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế.
- Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): không có dạng đặc hiệu.
- Mẫu dương tính: sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước bằng kích thước chứng dương.
- Mẫu âm tính: là sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.
- Kích thước sản phẩm PCR đặc hiệu nhóm G: 881 bp và nhóm P 663 bp

3.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Trong trường hợp chứng âm phản ứng dương tính mà chứng âm tách chiết âm tính thì làm lại từ khâu pha mix, trong trường hợp chứng âm phản ứng âm tính mà chứng âm tách chiết dương tính thì làm lại từ khâu tách chiết. Kết quả không cho kết quả rõ ràng hoặc trong trường hợp cần khẳng định chính xác kết quả, PXN có thể yêu cầu lấy lại bệnh phẩm và xét nghiệm theo thường quy của phòng từ bước nhận bệnh phẩm.
- Kết quả được kết luận là dương tính nếu:
 - + Mẫu chứng âm có kết quả âm tính.
 - + Mẫu chứng dương có kết quả dương tính.
 - + Mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính.
- Kết quả được kết luận là âm tính nếu:
 - + Mẫu chứng âm có kết quả âm tính.
 - + Mẫu chứng dương có kết quả dương tính.
 - + Mẫu bệnh phẩm có kết quả âm tính.
- Kết quả không được phép kết luận nếu:
 - + Mẫu chứng âm có kết quả dương tính (nhiễm).
 - + Mẫu chứng dương có kết quả âm tính.
- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

3.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán Rota.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả.

IV. Tài liệu tham khảo

1. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. 1992. "Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction". J Clin Microbiol.;30(6):1365-73.

2. World Health Organization (WHO). 2009. “Manual of rotavirus detection and characterization methods”. WHO/IVB/08.17

BỆNH THƯƠNG HÀN (TYPHOID FEVER)

Bệnh truyền nhiễm thuộc nhóm B trong Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm.

I. Mô tả chung

Bệnh sốt thương hàn (Typhoid fever) do vi khuẩn *Salmonella enteric* týp huyết thanh Typhi và Paratyphi A gây ra. Thương hàn là bệnh truyền nhiễm quan trọng ở các quốc gia thu nhập thấp và trung bình với hơn 22 triệu trường hợp mắc mới trên khắp thế giới và khoảng 200.000 tử vong hàng năm [1]. Nam và Đông Nam Á là khu vực nhiễm nhiều nhất trên thế giới, với tỷ lệ mắc hàng năm hơn 100/100.000 dân.

Biểu hiện lâm sàng của sốt thương hàn từ bệnh nhẹ với sốt nhẹ, mệt mỏi, ho khan đến bệnh nặng với nhiều biến chứng bao gồm thủng ruột. Chẩn đoán có thể chậm hoặc bỏ sót, trong lúc xem xét các bệnh sốt khác. Tính kháng kháng sinh của *S. enteric* týp Typhi và Paratyphi A cũng được ghi nhận trên khắp thế giới.

Chẩn đoán xác định bệnh thương hàn phụ thuộc vào việc phân lập *Salmonella* Typhi từ máu, tủy xương hoặc vết tổn thương trên da. Các triệu chứng lâm sàng của sốt thương hàn hoặc phát hiện đáp ứng kháng thể đặc hiệu chỉ là nghi ngờ bệnh sốt thương hàn.

Mặc dù môi trường mật bò (Oxgall) được khuyến cáo cho các tác nhân sốt thương hàn (*S. Typhi* và *S. Paratyphi A*), vì chỉ những tác nhân này mới có thể mọc được. Vì thế, trong PXN chẩn đoán tổng quát, nghi ngờ có các tác nhân khác hiện diện, nên sử dụng môi trường cấy máu chung. Hơn 80% bệnh nhân sốt thương hàn có tác nhân gây bệnh trong bệnh phẩm máu. Sự thất bại trong phân lập vi khuẩn có thể do nhiều yếu tố: (i) hạn chế của môi trường phòng thí nghiệm; (ii) có kháng sinh; (iii) thể tích bệnh phẩm nuôi cấy; hoặc (iv) thời điểm lấy mẫu, bệnh nhân có bệnh sử sốt 7-10 ngày khả năng nuôi cấy máu dương tính nhiều hơn. Nuôi cấy dịch hút tủy xương là chuẩn vàng cho chẩn đoán sốt thương hàn, và có giá trị đặc biệt cho bệnh nhân đã được điều trị trước đó, có bệnh sử bệnh kéo dài và cấy máu âm tính với thể tích máu được khuyến cáo. Nuôi cấy dịch hút tá tràng cũng chứng tỏ là xét nghiệm chẩn đoán phù hợp nhưng không được chấp thuận rộng rãi vì khó chịu đựng việc hút dịch tá tràng, đặc biệt ở trẻ em.

Các phương pháp xét nghiệm bao gồm (1) nuôi cấy (tăng sinh, phân lập, định danh) bằng phương pháp kính hiển vi (nhiộm Gram); tăng sinh canh thang BHI; tăng sinh trong chai cấy máu; phân lập trên đĩa thạch, định danh bằng sinh hóa (tự pha chế, hoặc kit thương mại, hoặc máy tự động), hoặc phổ khối (MALDI-TOF MS); (2) sinh học phân tử; và (3) huyết thanh học (phản ứng Widal, ELISA hoặc xét nghiệm nhanh).

Phương pháp xét nghiệm bệnh thương hàn trong nội dung hướng dẫn này bao gồm: (1) Phương pháp nuôi cấy và định danh, (2) Phương pháp PCR, (3) Phương pháp xét nghiệm nhanh chẩn đoán huyết thanh học.

II. Yêu cầu chung:

1. Nhân sự

- Có ít nhất 02 cán bộ có chuyên môn phù hợp và đã được đào tạo về các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán vi khuẩn bệnh thương hàn.
- Các cán bộ cần được đào tạo về cách sử dụng trang thiết bị, thực hành an toàn sinh học (ATSH), thực hành vi sinh chuẩn, và đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Các cán bộ PXN được đào tạo sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.
- Nhân viên mới sau khi đánh giá có kết quả đạt, cần tiếp tục được giám sát ít nhất 3 - 6 tháng trước khi chính thức được thực hiện xét nghiệm độc lập.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả xét nghiệm là cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh, có kinh nghiệm công tác trong lĩnh vực xét nghiệm từ 3 năm trở lên.
- Cán bộ PXN được kiểm tra sức khỏe định kỳ tối thiểu 1 lần hàng năm và nên được tiêm vắc xin thương hàn.

2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị

2.1. Cơ sở vật chất

- PXN cần đáp ứng về điều kiện ATSH, hệ thống quản lý chất lượng PXN theo quy định hiện hành. Các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán vi khuẩn thương hàn được áp dụng tại PXN ATSH cấp II trở lên.
- Đối với xét nghiệm PCR cần 4 khu vực riêng: khu vực pha dung dịch phản ứng (1), khu vực tách chiết DNA (2), khu vực đặt máy PCR (3) và khu vực điện di (4). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) → (2) → (3) → (4).

2.2. Trang thiết bị

Bảng 1. Trang thiết bị

Tên thiết bị	Nuôi cấy	PCR	Xét nghiệm huyết thanh học
Tủ ATSH phù hợp	1 cái	1 cái	1 cái
Kính hiển vi	1 cái		
Tủ ấm	1 cái		
Bếp đun/Lò vi sóng	1 cái	1 cái	

Tên thiết bị	Nuôi cấy	PCR	Xét nghiệm huyết thanh học
Pi pét (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	1 bộ	1 bộ	1 bộ
Máy ly tâm lạnh	1 cái	1 cái	1 cái
Máy vortex		1 cái	1 cái
Máy ly tâm nhỏ để bàn		1 cái	
Máy ủ nhiệt khô/nước chuyên dụng		1 cái	
Máy PCR		1 cái	
Máy điện di		1 cái	
Máy chụp ảnh gel		1 cái	
Tủ lạnh lưu mẫu	1 cái	1 cái	1 cái

- Hồ sơ thiết bị gồm: Hồ sơ lắp đặt thiết bị, lý lịch thiết bị, hướng dẫn sử dụng, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Hồ sơ đào tạo sử dụng trang thiết bị cho các nhân viên vận hành thiết bị.

3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm

3.1. Trước xét nghiệm

3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu

- Loại mẫu: mẫu máu (trẻ em 4ml, người lớn 10 ml), mẫu phân 5 gram, huyết thanh 1-3ml;

- Điều kiện bảo quản:

+ Mẫu máu được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong trường hợp thực hiện ngay việc tách huyết thanh xét nghiệm.

+ Mẫu huyết thanh cần bảo quản mẫu bệnh phẩm tại nơi lấy mẫu ở 2°C - 8 °C, trong trường hợp bảo quản trên 72 giờ cần bảo quản tại nhiệt độ -20°C hoặc thấp hơn. Mẫu bệnh phẩm sau khi được chuyển về PXN, trong trường hợp PXN tiến hành xét nghiệm ngay thì bảo quản 2°C - 8 °C. Nếu PXN chưa xét nghiệm thì bảo quản tại -20°C hoặc thấp hơn.

+ Mẫu phân bảo quản ở nhiệt độ phòng trong trường hợp thực hiện xét nghiệm ngay trong 2 giờ, sau 2 giờ thì cần bảo quản mẫu bệnh phẩm ở 2°C - 8 °C.

- Việc bảo quản trong quá trình vận chuyển theo quy định và theo hướng dẫn hiện hành.

- Tiêu chuẩn chấp nhận: Mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, đủ lượng mẫu, kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hoặc phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Tiêu chuẩn từ chối: Bị bất hoạt do nhiệt, bị trộn lẫn, bị tán huyết mạnh, bị nhiễm khuẩn.

- Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.2 về hủy mẫu tại hướng dẫn này.

3.1.2. **Hiệu chuẩn hiệu chỉnh máy móc/Trang thiết bị**

Tất cả các trang thiết bị cần thực hiện hiệu chuẩn, hiệu chỉnh, bảo dưỡng theo quy định.

3.1.3. **Kiểm tra chất lượng hóa chất, sinh phẩm và vật tư tiêu hao**

- Hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định và còn hạn sử dụng.

- Có hồ sơ theo dõi sử dụng sinh phẩm, hóa chất vật tư tiêu hao.

- Cần có hồ sơ đánh giá, kiểm soát chất lượng sinh phẩm, hóa chất.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

- Các loại sinh phẩm khi nhận về đều phải được kiểm tra.

- Quan sát bằng mắt thường xem các lọ hoá chất, sinh phẩm có bất thường không, ví dụ như bột nắp, rò rỉ, vẩn đục, thay đổi màu sắc.

- Kiểm tra mỗi lô sinh phẩm theo bộ mẫu gồm 2 mẫu dương và 1 mẫu âm của tác nhân mà PXN đang thực hiện theo quy trình xét nghiệm.

- Pha chế sinh phẩm phải luôn được đặt trong khay giữ lạnh và cất lại ngay sau khi dùng xong.

- Vật tư hóa chất được quản lý theo đúng theo quy định và đảm bảo sự sẵn có cho việc thực hiện xét nghiệm.

3.2. **Trong xét nghiệm**

3.2.1. **Nội kiểm**

Đối với test nhanh: sử dụng chứng nội kiểm trong bộ sinh phẩm nếu có.

Đối với nuôi cấy: chủng chuẩn luôn được dùng để kiểm tra trong quá trình xét nghiệm mẫu bệnh phẩm (các công đoạn nuôi cấy và kiểm tra chất lượng sinh phẩm môi trường)

Đối với PCR: kiểm soát mẫu chứng cho mỗi lần chạy PCR.

- Chứng âm:

- + Chứng âm phản ứng: phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp PCR.

- + Chứng âm tách chiết: mẫu tách chiết là nước tinh sạch không chứa nuclease và được tách chiết cùng mẫu bệnh phẩm và được tách chiết cùng mẫu bệnh phẩm, phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp PCR.

- Chứng dương: là DNA được tách chiết chủng chuẩn hoặc tương đương.

3.2.2. **Đánh giá từ bên ngoài**

Tham gia đánh giá từ bên ngoài (ngoại kiểm, liên phòng hoặc PXN tham chiếu) và thực hiện hành động khắc phục khi kết quả không đạt.

3.3. **Sau xét nghiệm**

3.3.1. **Bảo quản và lưu trữ mẫu bệnh phẩm**

- Trong trường hợp cần thiết, mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được lưu trong tủ lạnh (từ 2-8°C).
- Sau khi cất mẫu vào hộp nhân viên PXN ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào sổ lưu giữ mẫu.
- Tất cả các mẫu bệnh phẩm được xếp vào hộp theo thứ tự từng năm và có sổ lưu giữ mẫu và sơ đồ tủ lưu giữ.
- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích

3.3.2. **Tiêu hủy mẫu**

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:
- Mẫu bệnh phẩm bị từ chối (không đạt tiêu chuẩn).
- Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ.
- Cho bệnh phẩm cần hủy vào túi rác thải y tế, buộc miệng túi. Sử dụng túi nhựa hấp được, không bị rò rỉ, có quy định màu sắc, ký hiệu rõ ràng trên túi để đựng mẫu
- Hấp ướt tại 121⁰C trong 30 phút.
- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.
- Sau khi hoàn tất, kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt, các thông số trên máy đạt và lấy túi rác thải.
- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.
- Lập biên bản hủy mẫu theo quy định đảm bảo ATSH.

Lưu ý: lò hấp phải được thẩm định định kỳ bằng chỉ thị sinh học và/hoặc chỉ thị hóa học cấp độ phù hợp.

4. **Đọc và đánh giá kết quả**

- Kết quả cần được kiểm giám sát và đánh giá bởi ít nhất 2 người và phải được lưu dưới dạng văn bản và trong máy tính.
- Phải kiểm tra các kết quả của mẫu chứng thỏa mãn điều kiện (tùy theo phương pháp áp dụng) mới tiến hành đánh giá kết quả trên mẫu bệnh phẩm xét nghiệm.
- Nếu chúng không đạt thì không được đánh giá kết quả xét nghiệm của mẫu bệnh phẩm mà phải thực hiện lại xét nghiệm; cần tiến hành kiểm tra lại quá trình xét nghiệm bắt đầu từ khâu chuẩn bị, tình trạng của mẫu chứng để tìm hiểu rõ nguyên nhân cần khắc phục.

- Có quy định cụ thể cho trả kết quả cho các trường hợp thường quy, kết quả bất thường/ báo động, khẩn, tạm thời và quy trình xử lý khi trả kết quả nhầm, chậm.

5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm

5.1. Lập kế hoạch bố trí thử nghiệm

- Kế hoạch bao gồm: Người chuẩn bị mẫu, người thực hiện, người đánh giá kết quả; tiêu chuẩn đánh giá; thời gian chuẩn bị mẫu, cách thức chuẩn bị mẫu; các bước tiến hành xét nghiệm, báo cáo kết quả; phê duyệt kết quả xét nghiệm.

- Cần xác định từng phương pháp định tính/định lượng hoặc bán định lượng để xác định giá trị sử dụng cho từng phương pháp.

- Đối với mỗi phương pháp xét nghiệm khi bắt đầu được áp dụng tại PXN mà không có bất kỳ sự thay đổi nào về phương pháp và loại mẫu sẽ tiến hành xác định 03 chỉ tiêu kỹ thuật cơ bản: độ chính xác (accuracy), độ đặc hiệu (specificity), độ chụm (precision). Yêu cầu mỗi đợt thẩm định được lặp lại ít nhất 3 lần để tính độ chụm.

- Cỡ mẫu cần phải được tính toán cẩn thận để nghiên cứu thẩm định có độ tin cậy cao và có ý nghĩa thống kê.

5.2. Độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chụm:

Bảng 2: Cách tính kết quả

		Kết quả từ phương pháp mới	
		Dương tính	Âm tính
Kết quả từ phương pháp chuẩn	Dương tính	a	b
	Âm tính	c	d

- Độ nhạy = $a/(a+b) \times 100$

- Độ đặc hiệu = $d/(c+d) \times 100$

- Độ chính xác = $(a+b)/N \times 100$

- Âm tính giả = $b/(a+b) \times 100$

- Dương tính giả = $c/(c+d) \times 100$

- Độ chụm được xác định dựa trên độ lệch chuẩn và thể hiện dưới dạng hệ số biến thiên CV.

- Giá trị tiên đoán dương = $a/(a+c)$

- Giá trị tiên đoán âm = $d/(d+b)$

Đối với phương pháp nuôi cấy vi sinh: Xác định độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng. Sử dụng tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm.

Đối với phương pháp PCR: Xác định độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng. Sử dụng tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm.

5.3. Đánh giá kết quả

Việc xác nhận giá trị sử dụng phương pháp được kết luận là đạt khi độ chính xác, độ đặc hiệu, độ nhạy lớn hơn hoặc bằng giá trị chuẩn.

- Độ chính xác $\geq 90\%$;
- Độ đặc hiệu $\geq 90\%$;
- Độ nhạy $\geq 90\%$;
- Tỷ lệ dương tính giả $\leq 10\%$;
- Tỷ lệ âm tính giả $\leq 10\%$;

Sau khi các qui trình đạt yêu cầu thẩm định sẽ được trình cho quản lý kỹ thuật xem xét, và thông qua quản lý chất lượng để ban hành qui trình.

5.4. Xem xét định kỳ phương pháp xét nghiệm

- Cần xem xét tính hiệu quả của phương pháp xét nghiệm định kỳ hàng năm thông qua các tiêu chí kỹ thuật: Chính xác, Độ chụm. Nếu có yêu cầu thêm về tiêu chí kỹ thuật khác thì phải ghi rõ vào bản báo cáo kết quả. Nếu không có yêu cầu đặt biệt, 2 tiêu chí kỹ thuật trên có thể bố trí giống như thẩm định phương pháp ban đầu.

- Lưu hồ sơ tất cả các bước thực hiện trên bao gồm các bảng tổng hợp kết quả.

III. Phương pháp xét nghiệm

Bệnh phẩm làm xét nghiệm xác định bệnh thương hàn có thể là máu, huyết thanh, tủy xương, nước tiểu, phân,... Xét nghiệm chủ yếu là nuôi cấy vi sinh, chẩn đoán huyết thanh học và PCR. Tùy theo điều kiện trang thiết bị phù hợp có thể lựa chọn phương pháp xét nghiệm tối ưu.

1. Phương pháp nuôi cấy vi sinh

1.1. Phạm vi áp dụng:

Trong nội dung hướng dẫn này, các môi trường tổng hợp để tăng sinh, phân lập và thực hiện sinh hóa định danh được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho xét nghiệm xác định *Salmonella* Typhi và *Salmonella* Paratyphi A từ mẫu bệnh phẩm máu tại các PXN vi sinh.

1.2. Nguyên lý:

Bệnh phẩm được cấy vào chai cấy máu hoặc môi trường thạch và ủ ở điều kiện môi trường và nhiệt độ phù hợp tạo điều kiện cho vi khuẩn phát triển tốt nhằm tăng sinh vi khuẩn (nếu có) trong bệnh phẩm, các khuẩn lạc tách biệt được trên môi trường nuôi cấy. Môi trường tăng sinh sử dụng là canh thang BHI hoặc chai cấy máu hiếu khí. Thể tích máu cần đủ để đảm bảo khả năng phát hiện. Trong chai cấy máu một số hãng chứa hạt resin có vai trò xử lý mẫu máu sau khi được bơm vào môi trường cấy để tăng cường khả năng hồi phục của vi sinh vật. Các chai cấy máu dương tính sẽ được cấy trên môi trường thạch để phân lập vi khuẩn và thực hiện các phản ứng định danh.

1.3. An toàn sinh học:

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

1.4. Quy trình thực hiện:

1.4.1. Mẫu bệnh phẩm:

- Mẫu máu:
 - Thời điểm lấy mẫu: lấy mẫu trong giai đoạn sớm của bệnh để có kết quả dương tính cao. Sau khi điều trị kháng sinh, độ nhạy của cấy máu sẽ thấp.
 - Phương pháp lấy mẫu: lấy máu tĩnh mạch
 - Thể tích mẫu máu:
 - + Người lớn: 10ml
 - + Trẻ em: 4ml
 - Trong quá trình thu thập mẫu: đảm bảo các điều kiện vô trùng khi lấy máu.
 - Bảo quản và vận chuyển:
 - Sau quá trình thu thập mẫu, nhân viên lấy mẫu bơm mẫu ngay vào chai cấy máu phù hợp. Tỷ lệ giữa máu và môi trường canh thang là 1/10.
 - Mẫu máu đã cho vào chai nuôi cấy được giữ ở nhiệt độ phòng và chuyển đến PXN vi sinh càng sớm càng tốt (tối đa trong vòng 2 giờ).
 - Các loại mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu phân: Đối tượng lấy mẫu là bệnh nhân, người tiếp xúc, người lành mang trùng. Thời điểm lấy mẫu: lấy mẫu sớm ngay sau khi có biểu hiện bệnh và tốt nhất trước khi điều trị kháng sinh. Cấy phân có thể dương tính sau tuần đầu tiên nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, độ nhạy cấy phân thấp hơn nhiều so với cấy máu. Kết hợp cấy máu và cấy phân có thể tăng tỷ lệ phát hiện vi khuẩn. Mẫu phân ngoáy trực tràng bảo quản trong Cary Blair cho tỷ lệ phân lập thấp hơn.
 - + Tủy xương: cấy tủy xương có độ nhạy cao hơn, độ nhạy không giảm ngay cả trong trường hợp được điều trị kháng sinh đến 5 ngày trước đó. Tuy nhiên do khó lấy mẫu nên ít áp dụng.
 - + Nước tiểu: lấy mẫu sớm ngay sau khi có biểu hiện bệnh và tốt nhất trước khi điều trị kháng sinh. Cấy nước tiểu có thể dương tính sau tuần đầu tiên nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, độ nhạy cấy nước tiểu thấp hơn nhiều.
 - + Các mẫu khác: nốt ban đỏ, chất nôn, dịch tá tràng, dịch não tủy, dịch màng phổi hoặc từ màng mayer, hạch mạc treo và lách bệnh nhân tử vong.

1.4.2. Hóa chất, môi trường, vật tư tiêu hao

- Kim lấy máu
- Cồn 70°
- Găng tay
- Môi trường canh thang BHI (Nếu có điều kiện có thể sử dụng chai cấy máu hiếu khí thương mại cho người lớn/trẻ em).

- Môi trường phân lập (môi trường tổng hợp thương mại): Thạch BA, hoặc thạch nutrient và MC (có thể sử dụng thêm môi trường chọn lọc Hek/SS sẽ giúp nhận diện định nhanh khuẩn lạc).

- Môi trường định danh: Bộ sinh hóa định danh tự pha chế và thuốc thử sinh hóa (hoặc bộ sinh hóa thương mại, kit sinh hóa cho máy định danh tự động).

- Kháng huyết thanh định týp huyết thanh *Salmonella*: KHT O9, H:d, Vi cho *S. Typhi*; và O2, H:a, H:1, H:5 cho *S. Paratyphi A*.

- Hoặc sử dụng bộ KHT của Biorad (*Salmonella Typhi* and *Paratyphi A, B, C* #61261).

- Bộ thuốc nhuộm Gram.

- Dầu soi kính.

- Giấy lau thấu kính.

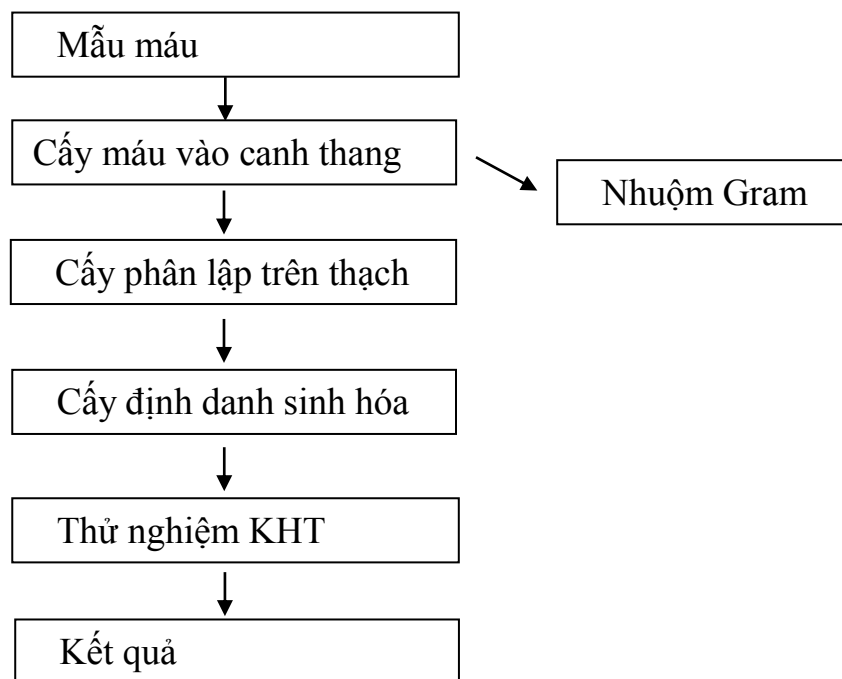
- Que cấy.

- Lam kính.

- Đèn busen/đèn cồn.

1.4.3. Các bước tiến hành

Phương pháp cấy máu cô điển:



Bước 1. Canh cấy mẫu máu được ủ ở 37°C trong tủ ẩm thông thường, hàng ngày quan sát bằng mắt để phát hiện sự thay đổi chuyển màu và đục của môi trường nuôi cấy (thời gian theo dõi đối với nuôi cấy *Salmonella* từ 1 – 10 ngày).

Bước 2. Cấy phân lập khi có chai cấy máu dương tính:

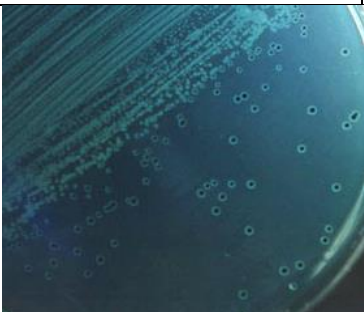
- Lấy (các) chai dương tính ra, lắc đều.
- Hút khoảng 1ml mẫu, nhỏ 5 – 6 giọt vào mỗi đĩa môi trường BA hoặc nutrient agar + MC để cấy phân lập (và cấy lên HEK/SS nếu cần) và 1 giọt nhỏ lên lam kính để nhuộm Gram.
- Tất cả các thao tác trên được thực hiện trong tủ ATSH.
- Ủ môi trường ở 37°C trong 18 – 24 giờ.

Bước 3. Nhuộm Gram quan sát hình thái vi khuẩn.

- *Salmonella* spp. là trực khuẩn Gram âm.
- Nếu kết quả nhuộm Gram ra hình thái khác thì cần lưu ý các tác nhân vi khuẩn khác.

Bước 4. Quan sát hình thái khuẩn lạc *Salmonella* spp. trên đĩa thạch.

- Trên đĩa BA: khuẩn lạc kích thước 2 -3 mm, tròn, trắng đục biên trong mờ, một số chủng có khuẩn lạc nhầy.
- Trên thạch MC: khuẩn lạc dẹt, tròn mịn, không màu.
- Trên thạch dinh dưỡng nutrient agar: khuẩn lạc dẹt, tròn, trắng đục.
- Trên thạch HEK/SS: khuẩn lạc nhỏ, dẹt, tròn, bờ đều, không màu, có hoặc không có tâm đen.

		
Nhuộm Gram <i>Salmonella</i> từ chai cấy máu	<i>Salmonella</i> trên BA	<i>Salmonella</i> trên Nutrient agar
		

<i>Salmonella</i> trên MC	<i>S. Typhi</i> trên HEK	<i>S. Typhi</i> trên SS
		
<i>S. Paratyphi A</i> trên HEK	<i>S. Paratyphi A</i> trên SS	

Hình 1: Hình ảnh nuôi cấy *Salmonella*

Bước 5. Sinh hóa định danh:

- Chọn khuẩn lạc điển hình trên môi trường thạch, cấy vào các môi trường sinh hóa định danh. Đồng thời cấy lên nutrient agar dùng cho thử KHT
- Ủ bộ sinh hóa ở 37°C/24 giờ.
- Đọc kết quả sinh hóa. Tra kết quả sinh hóa trên bảng chuẩn để xác định *Salmonella*.

Bảng 3: Bảng tra kết quả xét nghiệm sinh hóa

	Glucose	Lactose	Gas	H ₂ S	Indol	MR	VP	Citrate	Mannitol	Di động	Urease	LDC	ODC
<i>S. Typhi</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>S. Paratyphi A</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+

Ghi chú: (+): dương tính (-): âm tính

Bước 6. Xác định type huyết thanh.

- Dùng que cấy lấy một vòng đầy nước muối sinh lý cho lên lam kính.
- Dùng que cấy lấy 1 vòng vi khuẩn từ môi trường thạch dinh dưỡng
- Hòa đều vi khuẩn vào nước muối.
- Nếu thấy vi khuẩn tự ngưng kết thì không thực hiện tiếp tục .
- Nếu không thấy có hiện tượng tự ngưng kết, dùng que cấy lấy một vòng đầy vi khuẩn và trộn đều với một giọt kháng huyết thanh. Đọc kết quả sau tối đa 2 phút.
- Nếu xuất hiện các ngưng kết nhỏ li ti: dương tính.
- Nếu huyền dịch vi khuẩn trong nước muối vẫn đục: âm tính.

- Lưu ý: trường hợp thử KHT O âm tính nhưng KHT Vi dương tính, tạo huyền dịch vi khuẩn với nước muối sinh lý và đun cách thủy trong một giờ để hủy kháng nguyên Vi, sau đó ly tâm lấy cặn thử nghiệm lại KHT O.

Bảng 4: Công thức tít huyết thanh *Salmonella*

	O	H phase 1	H phase 2	Vi
S. Typhi	9	d	Không có	Dương tính
S. Paratyphi A	2	a	1,5	Không thử nghiệm

- Cách đọc tít huyết thanh *Salmonella* theo bộ KHT của Biorad (*Salmonella* Typhi and Paratyphi A, B, C #61261).

Bảng 5: Đọc tít huyết thanh *Salmonella* theo bộ KHT Biorad

T	A	B	C
<i>Salmonella</i> Typhi	S. Paratyphi A	S. Paratyphi B	S. Paratyphi C



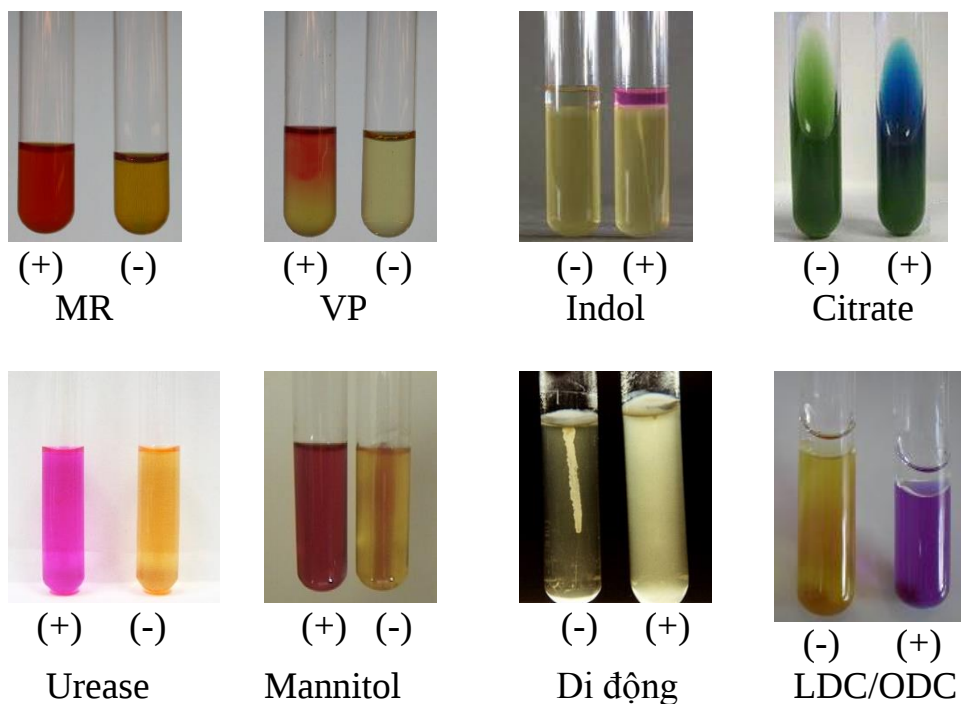
KIA S. Typhi (glucose +, lactose -, H₂S +, gas +)



KIA S. Paratyphi A (glucose +, lactose -, H₂S -, gas +)



KIA chưa sử dụng



Hình 2: Hình ảnh sinh hóa

1.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

1.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm:

Lưu ý khi đọc kết quả:

- Mẫu có thể ngoại nhiễm từ da (*Staphylococcus epidermidis*, *Propionobacterium acnes*, *Diphtheroides*,...), và từ môi trường xung quanh (*Clostridium* spp., *Acinetobacter* spp.).

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

1.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm:

- Mẫu dương tính khi phát hiện *Salmonella* Typhi hoặc *Salmonella* Paratyphi A trong mẫu.

- Mẫu âm tính khi không phát hiện *Salmonella* Typhi hoặc *Salmonella* Paratyphi A trong mẫu

- Mẫu nghi ngờ khi không có đầy đủ các tính chất sinh hóa như bảng chuẩn. Khi đó cần tiến hành lại thử nghiệm để kiểm tra.

1.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm phân lập và định danh *Salmonella*.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

2. Phương pháp xét nghiệm PCR

2.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này kỹ thuật tăng sinh mẫu trong canh thanh, kỹ thuật sốc nhiệt dùng tách chiết DNA mẫu cho phản ứng PCR được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho xét nghiệm xác định loài và type huyết thanh vi khuẩn *Salmonella* từ bệnh phẩm phân tại các PXN vi sinh.

2.2. Nguyên lý

DNA của vi khuẩn được tổng hợp từ mạch DNA khuôn với sự hiện diện của môi đặc hiệu và DNA polymerase. Trong phản ứng PCR, quá trình này được lặp lại nhiều lần tạo thành một lượng lớn sản phẩm, có thể phát hiện được dưới đèn UV sau khi điện di. Sử dụng những môi chuyên biệt phát hiện đặc hiệu cho *Salmonella*.

2.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

2.4. Thực hiện xét nghiệm

2.4.1. Mẫu bệnh phẩm

Bảng 6: Mẫu bệnh phẩm thu thập cho xét nghiệm PCR

Mẫu	Chứa trong	Chất thêm vào	Lượng mẫu cần có	Yêu cầu về lưu trữ/vận chuyển	Tiêu chí loại bỏ
Phân	Lọ vô trùng	Không	5 gam	Trữ ở nhiệt độ phòng: 2 giờ Trữ ở 2°C - 8°C: 2 giờ - 2 ngày	Không thỏa yêu cầu về lưu trữ/vận chuyển

2.4.2. Hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao:

- Nước cất hai lần/nước sử dụng cho sinh học phân tử
- Master mix 2X
- Môi đặc hiệu

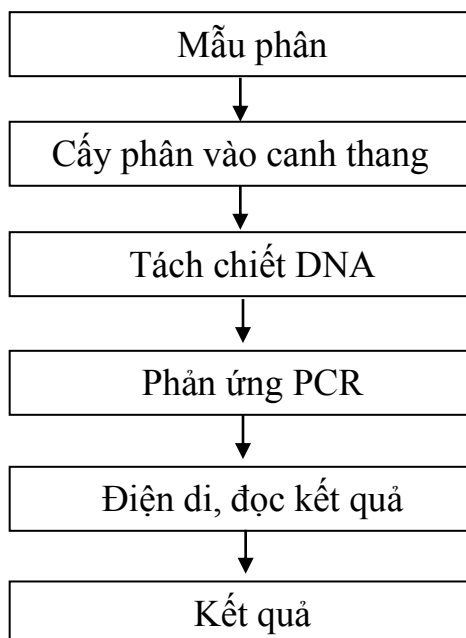
Bảng 7: Trình tự môi đặc hiệu sử dụng trong xét nghiệm

Môi	Trình tự	Phát hiện
STY-F STY-R	5'-CCTTCTGCAGTGGTTTCCAT-3' 5'-GATTACCCACAGGAAGCAC-3'	S. Typhi
SPA-F SPA-R	5'-CAGTCTGCTAACAGCACCAA-3' 5'-GTCACATGGGCAGCAGTCA-3'	S. Paratyphi A

- Thạch 1,5%.
- Dung dịch TBE 1X.
- Dụng cụ pha mix hỗn hợp phản ứng:
- Tuýp PCR 0,5µl.

- Đầu côn các loại (10, 200, 1000 μ l).
- Tube eppendorf (0,2ml, 0,5ml, 1,5ml).
- Giá để tube.

2.4.3. Các bước thực hiện



Bước 1. Tăng sinh mẫu

- Cấy 1 gam phân vào 10 ml môi trường canh thang Selenite F
- Ủ 37°C/4 giờ

Bước 2: Tách chiết DNA

- Hút 1 ml môi trường canh thang tăng sinh (bỏ cặn) cho vào một ống ly tâm vô trùng. Ly tâm 10.000 vòng/ phút trong 10 phút
- Hút bỏ dịch nổi, hòa cặn với 1 ml BPS. Ly tâm 10.000 vòng/ phút trong 10 phút. Thực hiện bước này 2 lần.
- Hút bỏ dịch nổi, hòa cặn với 200 μ l nước cất
- Sốc nhiệt ở 100 °C trong 10 phút
- Ly tâm 10.000 vòng/ phút trong 10 phút
- Hút 50 μ l dịch nổi có chứa DNA cho vào tube sạch để làm DNA khuôn. Bảo quản ở 2-8°C nếu sử dụng ngay, hoặc ở - 20°C nếu bảo quản lâu.

Bước 3. Thực hiện phản ứng PCR.

Bảng 8: Pha hỗn hợp phản ứng PCR (master mix)

Hóa chất	Nồng độ cuối	Thể tích/1 phản ứng	Thể tích/N phản ứng
Master mix 2X	1X	12,5 μ l	N x 12,5 μ l
Môi	0,2 pmol	0,5 μ l/mỗi môi	N x 0,5 μ l/mỗi môi
Nước cất		7,5 μ l	N x 7,5 μ l

- Chia vào N tube eppendorf 0,2 ml, mỗi tube 22 μ l.
- Cho DNA vào tuýp PCR: 3 μ l DNA/tube (thực hiện bên ngoài phòng pha hỗn hợp phản ứng).
- Thực hiện PCR trên máy luân nhiệt với chu trình sau:

Bảng 9: Chu trình nhiệt PCR

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
Khởi đầu biến tính	95°C	2 phút	1
Biến tính	95°C	1 phút	30
Bắt cặp	59°C	1 phút	
Kéo dài	72°C	2 phút	
	72°C	5 phút	1
Giữ ở 4°C			

2.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

2.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Chứng dương có kích thước theo hướng dẫn nhà sản xuất hoặc quy định của phòng xét nghiệm và hiện thị rõ trên giải điện di
- Chứng âm không có vạch trên gel và đúng kích thước
- Vạch có hình ảnh rõ nét và đẹp. Nếu vạch mờ, không rõ thì xem xét:
 - Thay dung dịch điện di
 - Tăng thể tích điện di
 - Thực hiện lại phản ứng.
- Mẫu chứng âm không xuất hiện vạch nào. Nếu thấy có vạch là đã bị nhiễm khi xét nghiệm, không công nhận kết quả và làm lại xét nghiệm theo quy trình một cách nghiêm ngặt.
- Mẫu chứng dương phải rõ và đúng kích thước. Nếu không thấy có vạch, có thể là:
 - DNA bị hủy toàn bộ
 - Hóa chất hoặc thiết bị có vấn đề (taq polymerase, máy luân nhiệt)
 - Nồng độ chứng dương quá cao.

2.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Mẫu dương tính khi tất cả các mẫu chứng đạt yêu cầu, vạch của mẫu có kích thước tương ứng với thang chuẩn và mẫu chứng
- Mẫu âm tính khi tất cả các mẫu chứng đạt yêu cầu, mẫu không có vạch hoặc vạch không đúng kích thước
- Mẫu nghi ngờ:
 - + Chứng dương và/hoặc mẫu có vạch mờ
 - + Mẫu có vạch đúng kích thước nhưng chứng dương không có vạch
- Kiểm tra chất lượng :
- Giới hạn phát hiện: 10^3 CFU/ml

- Độ đặc hiệu: 100%
- Mỗi lần xét nghiệm PCR, luôn phải tiến hành cùng với chứng dương, chứng âm.
- Chứng dương: *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi* A.
- Chứng âm: nước cất hai lần.
- Mẫu chứng cần cho thấy:
 - + Chứng âm: không có vạch.
 - + Chứng dương: cho vạch rõ và đúng kích thước.
- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

Bảng 10: Kết quả chạy PCR ở các bộ mồi

Mồi	Phát hiện	Kích thước sản phẩm (bp)
STY-F STY-R	<i>S. Typhi</i>	237
SPA-F SPA-R	<i>S. Paratyphi</i> A	607

2.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm phân lập và định danh *Salmonella*.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

3. Phương pháp xét nghiệm nhanh chẩn đoán huyết thanh học bệnh thương hàn

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit TYPHIDOT Rapid được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho xét nghiệm sắc ký miễn dịch, là phương pháp xét nghiệm đơn giản không yêu cầu nhiều về máy móc trang thiết bị, có thể thực hiện được tại các cơ sở y tế tuyến huyện và các phòng khám nhỏ.

3.1. Phạm vi áp dụng:

Phương pháp xét nghiệm miễn dịch sắc ký phát hiện kháng thể kháng vi khuẩn *Salmonella* trong mẫu huyết thanh bệnh nhân.

3.2. Nguyên lý:

TYPHIDOT Rapid IgM (Single) (Reszon Diagnostics, Malaysia) - xét nghiệm nhanh chẩn đoán sốt thương hàn: là thử nghiệm sắc ký miễn dịch pha rắn gián tiếp. Kháng nguyên (KN) *Salmonella* Typhi đặc hiệu được cố định trên dải màng nitrate cellulose. Khi cho mẫu vào miếng thấm mẫu, mẫu sẽ chạy lên trên. Nếu có kháng thể (KT) đặc hiệu hiện diện trong mẫu (huyết thanh hoặc huyết tương), sẽ tạo nên phức hợp KN-KT với KN được cố định ở vùng cửa sổ của xét nghiệm. Phức hợp KN-KT sau đó được phát hiện bởi IgG dê kháng IgM người cộng hợp thuốc

nhuộm sẽ cho màu hơi tím hồng của dung dịch đậm. Vạch chứng chứa kháng thể thử kháng IgG sẽ gắn với IgG thử kháng IgM người cộng hợp thuốc nhuộm. Vạch chứng cung cấp như một chỉ định của sự di chuyển đúng và chứng sinh phẩm.

TYPHIDOT Rapid IgG/IgM (Combo) (Reszon Diagnostics, Malaysia) - xét nghiệm nhanh chẩn đoán sốt thương hàn: là thử nghiệm sắc ký miễn dịch pha rắn gián tiếp. Kháng nguyên OMP đặc hiệu S. Typhi được cố định vào màng nitrate cellulose ở vạch xét nghiệm. Khi cho mẫu vào miếng thấm mẫu, mẫu sẽ chạy lên trên. Nếu có kháng thể (KT) IgG và IgM kháng S. Typhi hiện hiện trong mẫu (huyết thanh hoặc huyết tương), chúng sẽ phản ứng với phần tử nano vàng (colloidal gold) kháng với kháng thể IgG hoặc IgM người để tạo thành một phức hợp. Phức hợp sẽ tiếp tục di chuyển trên màng cellulose nitrate và kết dính được bắt ở khu vực cửa sổ xét nghiệm bởi kháng nguyên đặc hiệu OMP của S. Typhi đã được cố định, cho vạch màu hơi tím hồng. Vạch chứng chứa kháng thể thử kháng IgG chuột, nó sẽ gắn với các kháng thể chuột cộng hợp vàng kháng IgG hoặc IgM người. Vạch chứng cung cấp như một chỉ định của sự di chuyển đúng và chứng sinh phẩm.

3.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

3.4. Thực hiện xét nghiệm

3.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương
- Thể tích bệnh phẩm dùng trong xét nghiệm: 30 – 45 µl huyết thanh/huyết tương tùy loại kit thương mại.

Lưu ý: Bảo quản mẫu huyết thanh ở 2°C – 8°C trong vòng 3 ngày. Nếu chưa xét nghiệm ngay, bảo quản mẫu ở -20°C hoặc âm sâu hơn. Không làm đông tan mẫu quá 3 lần. Sau khi làm tan, phải trộn đều mẫu trước khi xét nghiệm.

3.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Bộ kit TYPHIDOT Rapid IgM hoặc TYPHIDOT Rapid IgG/IgM (Combo).
- Pi pet và đầu tip phù hợp (10-200 µl).

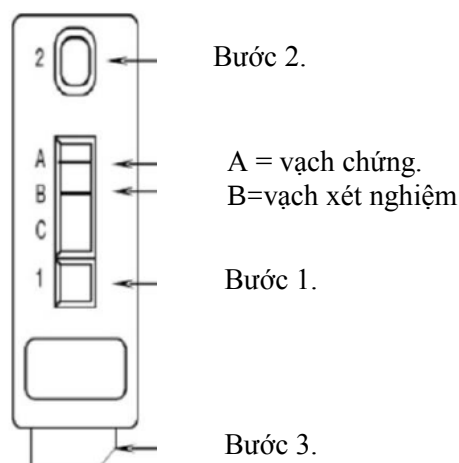
3.4.3. Các bước thực hiện

Thực hiện xét nghiệm bằng bộ sinh phẩm TYPHIDOT Rapid IgM theo các bước sau:

Bước 1. Cho 30 µl huyết thanh vào giếng vuông. Chờ cho đến khi huyết thanh qua vạch B. Tiến hành bước 2.

Bước 2. Cho 3 giọt dung dịch đậm vào giếng bên trên.

Bước 3. Đẩy dải sạch lên đến khi cảm thấy cản lại. Bắt đầu tính giờ. Thời gian đọc kết quả trong vòng 10 phút.



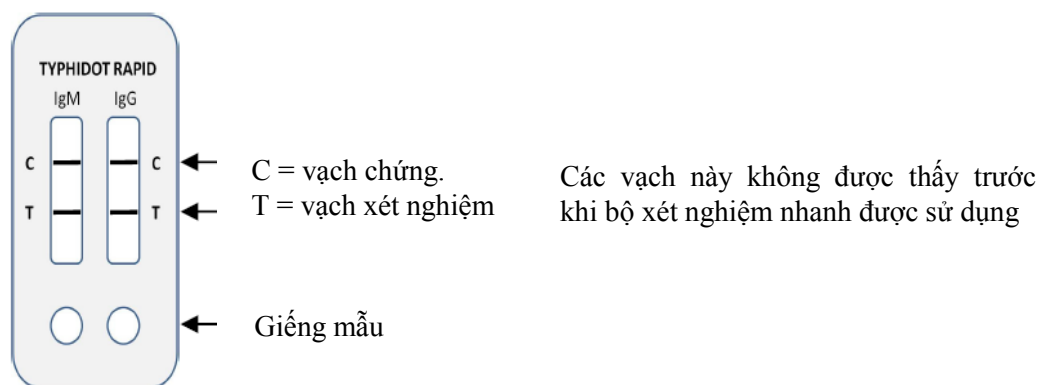
Hình 3: Minh họa các bước xét nghiệm TYPHIDOT Rapid IgM

Thực hiện xét nghiệm bằng bộ sinh phẩm TYPHIDOT Rapid IgG/IgM (Combo) [7]:

Bước 1. Cho 45 µl huyết thanh/huyết tương vào mỗi giếng mẫu, đảm bảo không có bóng khí.

Bước 2. Cho 1 giọt dung dịch đệm vào mỗi giếng mẫu. Huyết thanh/huyết tương sẽ bắt đầu chạy lên trên màng. Có thể vỗ nhẹ bộ xét nghiệm nhanh trên bàn để giúp mẫu chạy trên màng.

Bước 3. Đọc kết quả sau 20 phút.



Hình 5: Minh họa các bước xét nghiệm TYPHIDOT Rapid IgG/IgM (Combo)

3.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

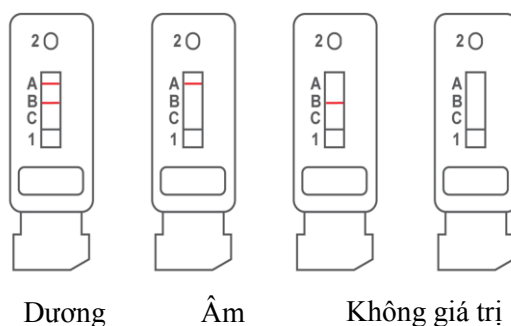
3.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- TYPHIDOT Rapid IgM: Nếu vạch chứng ở vị trí A không xuất hiện thì xét nghiệm không có giá trị. Mẫu dương sẽ phải có vạch màu ở vị trí B.

- TYPHIDOT Rapid IgG/IgM: Nếu vạch chứng ở vị trí C không xuất hiện thì xét nghiệm không có giá trị. Mẫu dương sẽ phải có vạch màu ở vị trí T.

3.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.
- TYPHIDOT Rapid IgM:



Hình 4: Nhận định kết quả xét nghiệm TYPHIDOT Rapid IgM

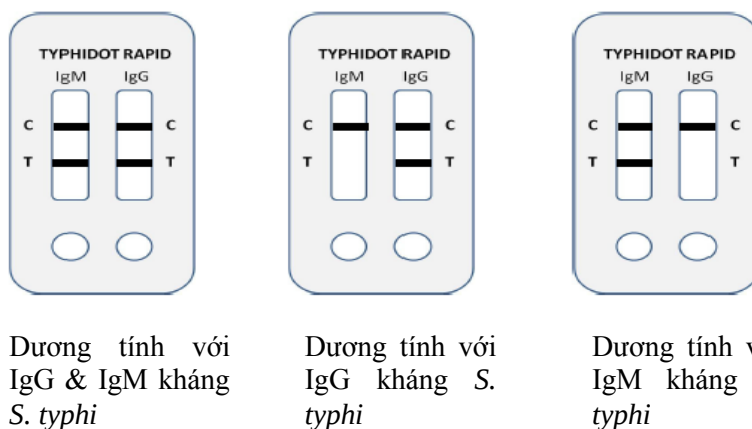
- Dương tính đối với kháng thể đặc hiệu Salmonella Typhi: khi dải màu xuất hiện ở vạch chứng (A) và vạch xét nghiệm (B)
- Âm tính đối với kháng thể đặc hiệu Salmonella Typhi: khi dải màu chỉ xuất hiện ở vạch chứng (A)
- Không giá trị: khi vạch chứng (A) không xuất hiện dải màu. Nếu trường hợp này xảy ra, xét nghiệm phải được làm lại với bộ xét nghiệm nhanh mới.

Lưu ý:

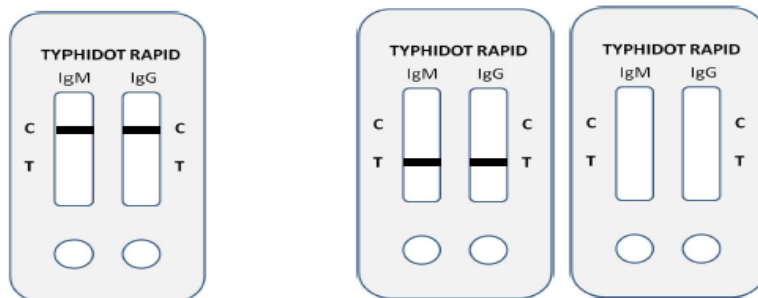
Để kit xét nghiệm và dung dịch đệm để ở nhiệt độ phòng (nếu thấy dung dịch đệm có tủa thì lắc mạnh và làm ấm lên). Mở túi lấy bộ xét nghiệm nhanh. Ghi nhãn mẫu lên bộ xét nghiệm nhanh.

Bảo quản ở 20oC - 25oC, tránh nắng, ẩm và nóng. Mỗi túi chứa 25 bộ xét nghiệm nhanh.

- TYPHIDOT Rapid IgG/IgM:



Hình 6(a): Minh họa các kết quả xét nghiệm TYPHIDOT Rapid IgG/IgM (Combo)



Âm tính với IgG
& IgM kháng *S.*
typhi

Không giá trị

Hình 6(b): Minh họa các kết quả xét nghiệm TYPHIDOT Rapid IgG/IgM (Combo)

- **Dương tính** đối với kháng thể đặc hiệu *Salmonella* Typhi: dải màu xuất hiện ở vạch chứng (C) và vạch xét nghiệm (T)
- **Âm tính** đối với kháng thể đặc hiệu *Salmonella* Typhi: dải màu chỉ xuất hiện ở vạch chứng (C)
- **Không giá trị**: khi vạch chứng (C) không xuất hiện dải màu. Nếu trường hợp này xảy ra, xét nghiệm phải được làm lại với bộ xét nghiệm nhanh mới.

Lưu ý:

- Để kit xét nghiệm và dung dịch đệm để ở nhiệt độ phòng (nếu thấy dung dịch đệm có tủa thì lắc mạnh và làm ấm lên). Mở túi lấy bộ xét nghiệm nhanh. Ghi nhãn mẫu lên bộ xét nghiệm nhanh.
- Bảo quản ở 4°C - 30°C, không đông băng. Tránh ánh nắng trực tiếp, ẩm và nóng. Mỗi túi chứa 25 bộ xét nghiệm nhanh.

3.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm phân lập và định danh *Salmonella*.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

IV. Tài liệu tham khảo

1. Hướng dẫn thẩm định và phê duyệt quy trình xét nghiệm, HDVK1-03-12.
2. Quy trình phân lập định danh *Salmonella* từ mẫu máu, HDVK-GS-XN-01-03, phiên bản 2, ngày 20/02/2014.
3. Quy trình PCR *Salmonella*, QTVK1-XN-09-17, phiên bản 1, ngày 05/01/2017.

4. Wijedoru L., Mallett S., Parry C.M., (2017), rapid diagnostic tests for typhoid and paratyphoid (enteric) fever (Review), *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 5, Art. No.: CD0008892. Doi: 10.1002/14651858.CD008892.pub2.
5. Review Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology, *Journal of Clinical Virology*, 2007.
6. TYPHIDOT Rapid IgM (A rapid test for detection of Typhoid fever).
7. TYPHIDOT Rapid IgG/IgM (Combo) version2 – A rapid test for detection of Typhoid fever), TF-RD0202_2014-04.
8. Tubex® TF Rapid typhoid detection. Version number 91-602-02.(C)IDLBiotech AB.
9. Ilargi Martinez-Ballesteros, Bianca Paglietti, Aitor Rementeria, Lorena Laorden, Maria Garcia-Ricobaraza, Joseba Bikandi, Salvator Rubino, Javier Garaizar (2012), Intra- and inter-laboratory evaluation of an improved multiplex-PCR method for detection and typing of *Salmonella*, *J Infect Dev Ctries*, 6(5): 443-451.
10. Bee Kim Lim and Kwai Lin Thong (2009), Application of PCR-based serogrouping of selected *Salmonella* serotypes in Malaysia, *J Infect Dev Ctries*, 3(6):420-428.

BỆNH VIÊM GAN B (HEPATITIS B)

Bệnh truyền nhiễm thuộc nhóm B trong Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm.

I. Mô tả chung

Viêm gan B (Hepatitis B) là một bệnh phổ biến, do vi rút viêm gan B (HBV) gây ra. HBV thuộc họ *Hepadnaviridae*, có cấu trúc DNA mạch vòng. HBV có 3 loại kháng nguyên HBsAg, HBeAg và HBcAg, tương ứng với 3 loại kháng thể Anti-HBs, Anti-HBe và Anti-HBc. Sự hiện diện của các kháng nguyên, kháng thể này rất quan trọng trong việc xác định bệnh, thể bệnh cũng như diễn tiến bệnh.

Theo ước tính của WHO, hiện nay có khoảng 257 triệu người nhiễm vi rút viêm gan B, và hơn 800 triệu người trên thế giới đã chết vì xơ gan và ung thư gan do HBV gây ra [3]. Tại Việt Nam, HBV là nguyên nhân hàng đầu gây bệnh viêm gan mạn với tỉ lệ nhiễm trong cộng đồng cao, chiếm từ 10-20% dân số [5].

Chẩn đoán xác định nhiễm HBV chủ yếu dựa vào xét nghiệm huyết thanh học. Nhiễm vi rút viêm gan B cấp tính được xác định dựa vào sự hiện diện của HBsAg và Anti-HBc IgM. Trong thời gian đầu nhiễm bệnh, bệnh nhân còn có chuyển đổi huyết thanh HBeAg. HBeAg thường chỉ thị cho mức độ sao chép của vi rút. Nhiễm HBV cấp tính được xác định dựa vào sự hiện diện dai dẳng của HBsAg trên 6 tháng (có hoặc không HBeAg) và dương tính Anti-HBc IgG.

Phương pháp xét nghiệm vi rút viêm gan B trong nội dung hướng dẫn này chỉ bao gồm 04 phương pháp xét nghiệm được dùng phổ biến trong hệ thống xét nghiệm y tế dự phòng: (1) phương pháp sắc ký miễn dịch, (2) phương pháp đánh dấu miễn dịch gắn enzyme (ELISA), (3) phương pháp miễn dịch điện hóa phát quang (ECLIA) và (4) phương pháp miễn dịch vi hạt hóa phát quang (CMIA). Các phương pháp xét nghiệm khác tham khảo trong Quyết định số 26/QĐ-BYT ngày 03/01/2013 của Bộ Y tế “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh Y học”.

II. Yêu cầu chung

1. Nhân sự

- Có ít nhất 02 cán bộ có chuyên môn phù hợp và đã được đào tạo về các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán viêm gan B.

- Các cán bộ cần được đào tạo về cách sử dụng trang thiết bị, thực hành an toàn sinh học (ATSH), thực hành vi sinh chuẩn, và đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Các cán bộ PXN được đào tạo sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

- Nhân viên mới sau khi đánh giá có kết quả đạt, cần tiếp tục được giám sát ít nhất 3 - 6 tháng trước khi chính thức được thực hiện xét nghiệm độc lập.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả xét nghiệm là cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học, có kinh nghiệm công tác trong lĩnh vực xét nghiệm từ 3 năm trở lên.

- Cán bộ PXN được kiểm tra sức khỏe định kỳ tối thiểu 1 lần hàng năm và được tiêm phòng viêm gan B và kiểm tra kháng thể hàng năm.

2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị

2.1. Cơ sở vật chất

PXN cần đáp ứng về điều kiện ATSH, hệ thống quản lý chất lượng PXN theo quy định hiện hành. Các kỹ thuật xét nghiệm HBsAg, anti-HBs được áp dụng cho PXN ATSH cấp II trở lên.

2.2. Trang thiết bị

Bảng 1: Trang thiết bị

Tên thiết bị	Xét nghiệm nhanh	ELISA	Miễn dịch tự động CMIA	Miễn dịch tự động ECILA
Máy ELISA		01 bộ		
Máy miễn dịch tự động Architect			01 bộ	
Máy miễn dịch tự động Cobas e601				01 bộ
Pi pét 1 kênh (10µl, 100 µl, 1000 µl)	01 bộ	01 bộ	01 bộ	01 bộ
Tủ ATSH phù hợp		01 cái	01 cái	01 cái
Máy ly tâm thường		01 cái	01 cái	01 cái
Tủ lạnh 2°C-8°C	01 cái	01 cái	01 cái	01 cái
Tủ âm -20°C hoặc thấp hơn (bảo quản mẫu)		01 cái	01 cái	01 cái

- Hồ sơ thiết bị gồm: hồ sơ lắp đặt thiết bị, lý lịch thiết bị, hướng dẫn sử dụng, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Hồ sơ đào tạo sử dụng trang thiết bị cho các nhân viên vận hành thiết bị.

3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm

3.1. Trước xét nghiệm

3.1.1. **Đảm bảo chất lượng mẫu**

- Loại mẫu: Mẫu máu, từ 2-3 ml trong ống không chứa chất chống đông hoặc ống có chất chống đông Potassium EDTA (hay Lithium Heparin, Sodium Heparin, Sodium Citrat).

- Điều kiện bảo quản:

- Mẫu máu làm xét nghiệm HBsAg: có thể được bảo quản đến 24 giờ ở nhiệt độ phòng hay đến 6 ngày ở 2°C - 8°C, sau 6 ngày cần tách huyết thanh/ huyết tương bằng cách ly tâm ở 800-1600 g trong vòng 20 phút hoặc bảo quản đông lạnh ở -20°C hoặc thấp hơn. Mẫu đã tách huyết thanh hoặc huyết tương có thể được giữ 14 ngày ở 2°C - 8°C, nếu giữ lâu hơn nên đông lạnh ở - 20°C hoặc thấp hơn.

- Mẫu máu làm xét nghiệm Anti-HBs: có thể được bảo quản ở 2°C - 8°C tối đa đến 14 ngày, sau 14 ngày cần tách huyết thanh/ huyết tương bằng cách ly tâm ở 800 g - 1600 g trong vòng 20 phút hoặc bảo quản đông lạnh ở -20°C hoặc thấp hơn. Mẫu đã tách huyết thanh hoặc huyết tương có thể được giữ 14 ngày ở 2°C - 8°C, nếu giữ lâu hơn nên đông lạnh ở - 20°C hoặc thấp hơn.

- Trường hợp mẫu có fibrin, tế bào hồng cầu hay các vật thể lạ khác hay mẫu đã được bảo quản đông lạnh và rã đông, để đảm bảo tính nhất quán của kết quả, mẫu phải chuyển qua tuýp ly tâm và ly tâm ít nhất ở >10.000 RCF trong 10 phút trước khi xét nghiệm.

- Việc bảo quản trong quá trình vận chuyển theo quy định và theo hướng dẫn hiện hành.

- Tiêu chuẩn chấp nhận: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, đủ lượng mẫu, kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hoặc phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Tiêu chuẩn từ chối:

- Bị bất hoạt do nhiệt, bị trộn lẫn, bị tán huyết mạnh, bị nhiễm khuẩn.

- Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.2 về hủy mẫu tại hướng dẫn này.

3.1.2. **Hiệu chuẩn, hiệu chỉnh máy móc/trang thiết bị**

Tất cả các trang thiết bị cần thực hiện việc hiệu chuẩn, hiệu chỉnh, bảo dưỡng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

3.1.3. **Kiểm tra chất lượng hóa chất sinh phẩm và vật tư tiêu hao**

- Hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định và còn hạn sử dụng.

- Có hồ sơ theo dõi sử dụng sinh phẩm, hóa chất vật tư tiêu hao.

- Cần có hồ sơ đánh giá, kiểm soát chất lượng sinh phẩm, hóa chất.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

- Các loại sinh phẩm khi nhận về đều phải được kiểm tra.
- Quan sát bằng mắt thường xem các lọ hoá chất, sinh phẩm có bất thường không, ví dụ như bật nắp, rò rỉ, vẩn đục, thay đổi màu sắc.
- Kiểm tra mỗi lô sinh phẩm theo bộ mẫu gồm các mẫu chứng dương và mẫu chứng âm của tác nhân mà PXN đang thực hiện theo quy trình xét nghiệm.
- Pha chế sinh phẩm phải luôn được đặt trong khay giữ lạnh và cất lại ngay sau khi dùng xong.
- Vật tư hóa chất được quản lý theo đúng theo quy định và đảm bảo sự sẵn có cho việc thực hiện xét nghiệm.

3.2. Trong xét nghiệm

3.2.1. Nội kiểm

Đối với test nhanh: sử dụng chứng nội kiểm trong bộ sinh phẩm.

Đối với xét nghiệm ELISA: sử dụng các mẫu chứng theo bộ sinh phẩm

- Chứng âm: chứa huyết thanh người bình thường
- Chứng dương: chứa huyết thanh người đã bất hoạt virus

Đối với xét nghiệm ECLIA và CMIA: sử dụng các mẫu chứng theo bộ sinh phẩm do nhà sản xuất cung cấp.

- Chứng âm có thành phần là huyết tương người đã vô hiệu hóa lại.
- Chứng dương có thành phần là HBsAg từ người đã tinh sạch bất hoạt (xét nghiệm HBsAg) hoặc có phản ứng với Anti-HBs và không có phản ứng với HBsAg (xét nghiệm Anti-HBs).
- Chứng âm: phản ứng phải cho kết quả âm tính.
- Kết quả của 02 chứng dương phải nằm trong khoảng nồng độ cho phép của nhà sản xuất thì được chấp nhận (giá trị này có in trong tài liệu đi kèm hộp thuốc thử) và nằm trong khoảng ± 2 SD do PXN xây dựng.

3.2.2. Đánh giá từ bên ngoài

Tham gia đánh giá từ bên ngoài (ngoại kiểm, liên phòng hoặc PXN tham chiếu) và thực hiện hành động khắc phục khi kết quả không đạt.

3.3. Sau xét nghiệm

3.3.1. Bảo quản và lưu trữ mẫu bệnh phẩm

- Trong trường hợp cần thiết, mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được lưu trong tủ lạnh (từ -70°C hoặc thấp hơn).
- Sau khi cất mẫu vào hộp nhân viên PXN ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào sổ lưu giữ mẫu.
- Tất cả các mẫu bệnh phẩm được xếp vào hộp theo thứ tự từng năm và có sổ lưu giữ mẫu và sơ đồ tủ lưu giữ.
- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

3.3.2. Tiêu hủy bệnh phẩm

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:

- + Mẫu bệnh phẩm bị từ chối (không đạt tiêu chuẩn).
- + Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ.
- Cho bệnh phẩm cần hủy vào túi rác thải y tế, buộc miệng túi. Sử dụng túi nhựa hấp được, không bị rò rỉ, có quy định màu sắc, ký hiệu rõ ràng trên túi để đựng mẫu
- Hấp ướt tại 121⁰C trong 30 phút.
- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.
- Sau khi hoàn tất, kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt, các thông số trên máy đạt và lấy túi rác thải.
- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.
- Lập biên bản hủy mẫu theo quy định đảm bảo ATSH.
- **Lưu ý:** Lò hấp phải được thẩm định định kỳ bằng chỉ thị sinh học và/hoặc chỉ thị hóa học cấp độ phù hợp.

4. Đọc và đánh giá kết quả

- Kết quả cần được kiểm giám sát và đánh giá bởi ít nhất 2 người và phải được lưu dưới dạng văn bản và trong máy tính.
- Phải kiểm tra các kết quả của mẫu chứng thỏa mãn điều kiện (tùy theo phương pháp áp dụng) mới tiến hành đánh giá kết quả trên mẫu bệnh phẩm xét nghiệm.
- Nếu chúng không đạt thì không được đánh giá kết quả xét nghiệm của mẫu bệnh phẩm mà phải thực hiện lại xét nghiệm; cần tiến hành kiểm tra lại quá trình xét nghiệm bắt đầu từ khâu chuẩn bị, tình trạng của mẫu chứng để tìm hiểu rõ nguyên nhân cần khắc phục.
- Có quy định cụ thể cho trả kết quả cho các trường hợp thường quy, kết quả bất thường/ báo động, khẩn, tạm thời và quy trình xử lý khi trả kết quả nhầm, chậm.

5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm

5.1. Lập kế hoạch bố trí thử nghiệm

- Kế hoạch bao gồm: Người chuẩn bị mẫu, người thực hiện, người đánh giá kết quả; tiêu chuẩn đánh giá; thời gian chuẩn bị mẫu, cách thức chuẩn bị mẫu; các bước tiến hành xét nghiệm, báo cáo kết quả; phê duyệt kết quả xét nghiệm.
- Cần xác định từng phương pháp định tính/định lượng hoặc bán định lượng để xác định giá trị sử dụng cho từng phương pháp,
- Đối với mỗi phương pháp xét nghiệm khi bắt đầu được áp dụng tại PXN mà không có bất kỳ sự thay đổi nào về phương pháp và loại mẫu sẽ tiến hành xác định 03 chỉ tiêu kỹ thuật cơ bản: độ chính xác (accuracy), độ đặc hiệu (specificity), độ chụm (precision). Yêu cầu mỗi đợt thẩm định được lặp lại ít nhất 3 lần để tính độ chụm.

- Cỡ mẫu cần phải được tính toán cẩn thận để nghiên cứu thẩm định có độ tin cậy cao và có ý nghĩa thống kê. Chuẩn chuẩn: tối thiểu 10 chủng. Mẫu thực tế: tối thiểu 20 mẫu

5.2. Độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chụm

- Bố trí thực hiện bộ mẫu đã được xác định kết quả bằng quy trình tiêu chuẩn hoặc kiểm tra lại kết quả bằng chương trình so sánh liên phòng.
- Thực hiện xét nghiệm như đối với các mẫu của bệnh nhân

Bảng 2. Đọc đánh giá xét nghiệm

Kết quả tại PXN	Kết quả của quy trình tiêu chuẩn	
	Dương tính	Âm tính
Dương tính	A	B
Âm tính	C	D

- Tính toán số liệu:
 - + Độ chính xác (Accuracy) = $(a+d)/N$
 - + Độ đặc hiệu (Specificity) = $d/(c+d)$
 - + Độ nhạy (Sensitivity) = $a/(a+b)$
 - + Giá trị tiên đoán dương tính (Positive Predictable Value) = $a/(a+c)$
 - + Giá trị tiên đoán âm tính (Negative Predictable Value) = $d/(b+d)$

Trong đó: $N = a + b + c + d$ tổng số kết quả xét nghiệm
 - Độ chụm (gồm độ lặp và độ tái lặp):
 - + Chuẩn bị mẫu có nồng độ xung quang LOD tính toán, lặp lại xét nghiệm 20 lần.: **LOD** = **Y** + **3S** Trong đó: **Y** : kết quả trung bình **S**: độ lệch chuẩn
 - + Bố trí thực hiện bộ mẫu để kiểm tra tính chính xác gồm 5 mẫu/nồng độ x 2 nồng độ và 3 lần lặp/mẫu x 3 mẫu
 - + Độ lặp: Bộ mẫu được thực hiện lặp lại trong cùng một điều kiện về con người, sinh phẩm và thiết bị.
 - + Độ tái lặp: Bộ mẫu được thực hiện lặp lại trong cùng một điều kiện về sinh phẩm và thiết bị nhưng thay đổi về con người, thời gian.
 - + Thực hiện xét nghiệm như đối với các mẫu của bệnh nhân.
 - + Tính toán số liệu:
 - ✓ Giá trị trung bình (Mean) $\bar{y} = \sum y_i / n$
 - ✓ Độ lệch chuẩn (lặp và tái lặp) (SD) $SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$
 - ✓ Hệ số biến thiên (CV) $CV = (sd/\bar{y}) * 100$

Trong đó: y_i là giá trị thu được trong mỗi lần thực hiện xét nghiệm. n là số lần làm lặp lại.
- Đối với phương pháp test nhanh (định tính):** làm độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng. Theo CSI tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm

Đối với xét nghiệm HBsAg (bán định lượng): Đối với xét nghiệm bán định lượng thực hiện độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chụm, giới hạn phát hiện (LOD)

Đối với xét nghiệm Anti-HBs (định lượng): thực hiện độ chính xác, độ chụm, LOD, LOQ (ngưỡng định lượng), khoảng tuyến tính (nếu có), các thông số ảnh hưởng. Cần tối thiểu 20 điểm dữ liệu cho mỗi chỉ số đánh giá. Chọn ít nhất 20 mẫu đã biết trước nồng độ bằng cách sử dụng một phương pháp xét nghiệm chuẩn khác. Chọn các mẫu có kết quả phân bố ở các giá trị từ thấp đến cao. Chạy song song 20 mẫu này bằng 2 phương pháp chuẩn và phương pháp cần xác nhận. Vẽ đường thống kê hồi quy biểu diễn mối tương quan giữa 2 phương pháp. Nếu đường biểu diễn không trùng hoặc gần trùng với đường phân giác, so sánh sự khác biệt của hai phương pháp bằng cách so sánh SD của 2 phương pháp (t-test và f-test). Các mẫu được xét nghiệm trong 3 ngày liên tiếp.

5.3. Đánh giá kết quả

- Dựa vào việc so sánh các kết quả thực hiện so với tiêu chuẩn của quy trình tiêu chuẩn hoặc tiêu chuẩn tham chiếu (CLIA)

- Việc xác nhận giá trị sử dụng phương pháp được kết luận là đạt khi:

- + Độ nhạy, độ đặc hiệu lớn hơn hoặc bằng giá trị của quy trình tiêu chuẩn hoặc tiêu chuẩn tham chiếu

- + Tỷ lệ dương tính giả, âm tính giả nhỏ hơn hoặc bằng giá trị của quy trình tiêu chuẩn.

- + Chấp nhận khi kết quả đạt

- ✓ Độ chính xác $\geq 90\%$;

- ✓ Độ đặc hiệu $\geq 90\%$;

- ✓ Độ nhạy $\geq 90\%$;

- ✓ Tỷ lệ dương tính giả $\leq 10\%$;

- ✓ Tỷ lệ âm tính giả $\leq 10\%$.

- + + Độ chính xác: Đường biểu diễn mối tương quan giữa phương pháp đánh giá và phương pháp tiêu chuẩn phải trùng hoặc gần trùng với đường phân giác. ($a \sim 1$, $b \sim 0$) hoặc giá trị f tính toán phải nhỏ hơn giá trị f tra bảng f-test với cỡ mẫu $n = 20$.

- + + Độ chụm: So sánh với độ lệch chuẩn lặp lại do nhà sản xuất cung cấp. Độ lệch chuẩn thực nghiệm cần nhỏ hơn hoặc bằng độ lệch chuẩn công bố hoặc kết quả hệ số biến thiên $CV < 10\%$.

- + + LOD, LOQ, khoảng tuyến tính: Công bố ngưỡng phát hiện, ngưỡng định lượng và khoảng tuyến tính thực tế tại phòng xét nghiệm. Đánh giá, nhận xét bằng cách so sánh với thông tin được công bố bởi nhà sản xuất.

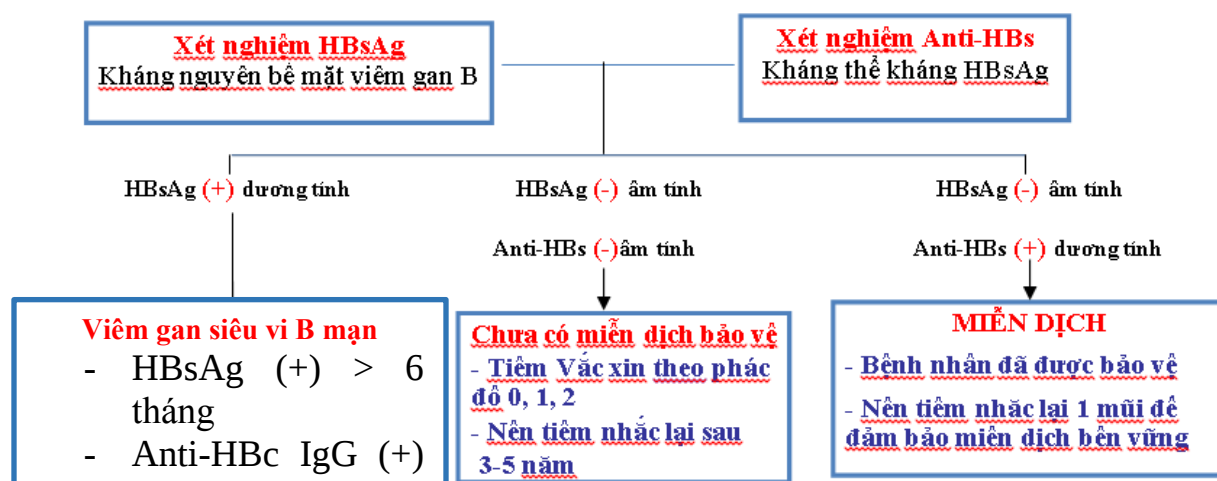
5.4. Xem xét định kỳ phương pháp xét nghiệm

- Cần xem xét tính hiệu quả của phương pháp xét nghiệm định kỳ hàng năm thông qua các tiêu chí kỹ thuật: Độ tái lập (tổng hợp từ kết quả kiểm tra chất

lượng trong năm), Kết quả tham gia ngoại kiểm, Lỗi hệ thống (áp dụng cho các phương pháp có sử dụng thiết bị). Nếu có yêu cầu thêm về tiêu chí kỹ thuật khác thì phải ghi rõ vào bản báo cáo kết quả. Nếu không có yêu cầu đặt biệt, các tiêu chí kỹ thuật trên có thể bố trí giống như thẩm định phương pháp ban đầu.

- Lưu hồ sơ tất cả các bước thực hiện trên bao gồm các bảng tổng hợp kết quả.

III. Phương pháp xét nghiệm



Sơ đồ 1: Sơ đồ xét nghiệm Viêm gan siêu vi B

1. Xác định kháng nguyên HBsAg bằng test nhanh

1.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này bộ Determine HBsAg của Abbott được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho xét nghiệm HBsAg test nhanh. Phương pháp xét nghiệm này phát hiện kháng nguyên HBsAg của HBV trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần.

1.2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch *in vitro* để xác định định tính kháng nguyên bề mặt của vi rút viêm gan B.

1.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

1.4. Thực hiện xét nghiệm

1.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần có chất chống đông EDTA.

- Tách huyết thanh/ huyết tương đối với bệnh phẩm máu: Sau khi lấy máu, để ổn định 30 phút ở nhiệt độ phòng, tiến hành tách huyết thanh/huyết tương. Trong trường hợp không tách được huyết tương/huyết thanh, quản ở nhiệt độ 2°C - 8°C và cần phải tách huyết thanh ngay trong vòng 24 giờ bằng cách ly tâm ở 800 - 1600 g trong vòng 10 phút.

1.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Bộ sinh phẩm Abbott Determine HBsAg cho huyết thanh/ huyết tương hoặc máu toàn phần.

- Pipet 50 µl -100 µl.

- Máy ly tâm.

- Đồng hồ bấm giây.

1.4.3. Các bước thực hiện

Bước 1. Lấy thanh thử phù hợp với số lượng mẫu cần xét nghiệm. Bóc bỏ tấm vỏ bọc bảo vệ.

Bước 2. Ghi tên hoặc mã bệnh nhân vào vùng viết mã. Để que thử trên mặt phẳng khô sạch.

Bước 3. Nhỏ 50 µl huyết thanh/huyết tương/máu toàn phần vào vùng nhỏ bệnh phẩm. Đối với huyết thanh/huyết tương, đợi tối thiểu 15 phút và đọc kết quả. Đối với mẫu máu toàn phần, đợi 1 phút rồi thêm 1 giọt Chase Buffer, sau đó đợi tối thiểu 15 phút và đọc kết quả.

1.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

1.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

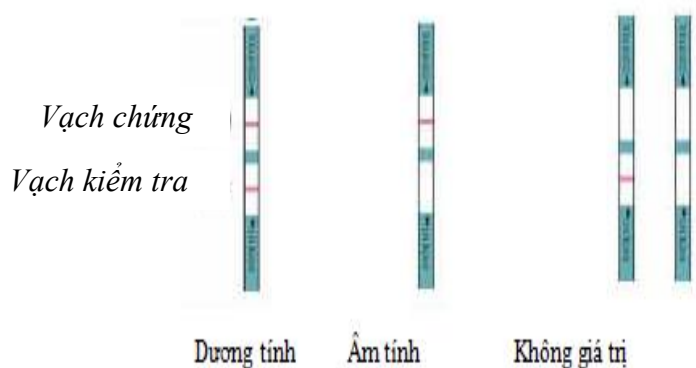
- Dương tính: Xuất hiện 2 vạch đỏ ở phần chứng và phần bệnh phẩm.

- 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.



Hình 1: Đọc kết quả xét nghiệm Determine HBsAg

1.5.2. Nhận định kết quả

- Kiểm tra chất lượng mẫu thử: Để đảm bảo giá trị xét nghiệm, vạch control phải xuất hiện.
- Nếu vạch control không chuyển sang màu đỏ hay hồng, test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.
- Độ đậm nhạt của vạch không tương quan với nồng độ kháng nguyên HBsAg trong mẫu.
- Kết quả âm tính có thể xảy ra khi bệnh nhân trong giai đoạn sớm của bệnh (mức HBsAg thấp).
- Đối với mục đích chẩn đoán và phân biệt nhiễm HBV mạn tính hay cấp tính, việc phát hiện HBsAg phải tương quan với triệu chứng của bệnh nhân và các chỉ số miễn dịch khác.
- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

1.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

2. Xác định HBsAg miễn dịch gắn enzyme (ELISA)

2.1..Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit Murex HBsAg 3.0 được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho xét nghiệm HBsAg (ELISA). Phát hiện kháng nguyên bề mặt HBsAg của HBV trong huyết thanh (huyết tương) người.

2.2.Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA sử dụng hỗn hợp kháng thể đơn dòng của chuột chuyên biệt các thụ thể khác nhau trên vùng quyết định kháng nguyên “A” của HBsAg và kháng thể đã được tinh sạch có ái lực với HBsAg cộng hợp với peroxidase. Khi có sự hiện diện của HBsAg trong mẫu bệnh phẩm, sẽ tạo nên một phức hợp kháng thể - kháng nguyên - kháng thể - enzyme. Phản ứng của enzyme và cơ chất tạo ra sự chuyển màu từ tím sang cam.

2.3.An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

2.4.Thực hiện xét nghiệm

2.4.1. Mẫu bệnh phẩm

Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần có chất chống đông EDTA (Tham khảo mục 1.4.1).

2.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Bộ sinh phẩm Murex HbsAg 3.0
- Pipet 20 µl -100 µl và đầu tip tương ứng.

2.4.3. Các bước thực hiện

Bước 1. Chuẩn bị dung dịch cơ chất và dung dịch rửa theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bước 2. Chuẩn bị số giếng cần thiết cho số lượng mẫu cần thực hiện xét nghiệm (bao gồm mẫu phản ứng và mẫu chứng).

Bước 3. Thêm 25 µl dung dịch pha loãng vào mỗi giếng.

Bước 4. Thêm 75 µl bệnh phẩm vào mỗi giếng theo sơ đồ .

Bước 5. Ủ đĩa có nắp đậy ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ trong vòng 30 phút.

Bước 6. Thêm 50 µl dung dịch chất cộng hợp vào mỗi giếng.

Bước 7. Lắc đĩa trên máy lắc hoặc gõ nhẹ cạnh đĩa trong 10 giây.

Bước 8. Ủ đĩa có nắp đậy ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ trong vòng 30 phút.

Bước 9. Sau thời gian ủ, rửa đĩa 5 lần.

Bước 10. Thêm 100 µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.

Bước 11. Ủ đĩa có nắp đậy ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ trong vòng 30 phút đợi chuyển màu.

Bước 12. Thêm 50 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

Bước 13. Trong vòng 15 phút, đọc kết quả ở bước sóng 450 nm/620 nm

Bảng 4: Sơ đồ mẫu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Chứng dương											
B	Chứng âm											
C	Mẫu A											
D	Mẫu B											
E	Mẫu C											
F	Mẫu D											
G	Mẫu E											
H	Mẫu F											

Ghi chú: Phân ô trống điền thông tin mẫu

2.5. Phân giải kết quả xét nghiệm

2.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Chứng dương: có tín hiệu huỳnh quang phù hợp theo hướng dẫn nhà sản xuất hoặc theo quy định của phòng xét nghiệm.

- Chứng âm: tính giá trị trung bình hấp thụ ánh sáng của 2 chứng âm. Nếu 1 trong 2 giếng chứng âm có giá trị $> 0,03$ giếng kia thì loại bỏ giá trị cao hơn.

- Giá trị ngưỡng (Cut-off value: CO) = Giá trị trung bình của chứng âm + 0,05

- Kết quả âm tính: $A_{450/\text{ref}} < \text{CO}$

- Kết quả dương tính: $A_{450/\text{ref}} > \text{CO}$

2.5.2. Nhận định, xem xét, phê duyệt kết quả

- Mẫu dương tính nên được xét nghiệm lại bằng 2 phản ứng sử dụng mẫu ban đầu. Mẫu có kết quả tối thiểu 1 trong 2 phản ứng dương tính, mẫu có hiện diện HBsAg. Kết quả dương tính nên được khẳng định bằng bộ kit xác định hoặc các xét nghiệm marker HBV khác.

- Nếu cả 2 phản ứng đều âm tính, kết quả được xác định là âm tính.
- Mẫu không xác định khi không thỏa mãn các điều kiện sau:
- Giá trị trung bình $A_{450/ref}$ của chứng âm $< 0,15$ hoặc giá trị trung bình của A_{450} của chứng âm $< 0,2$
- $A_{450/ref} / A_{450}$ của chứng dương cao hơn $A_{450/ref} / A_{450}$ của chứng âm 0,8
- Các mẫu không xác định cần phải được thực hiện lại xét nghiệm.
- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

2.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

3. Xác định HBsAg miễn dịch tự động bằng phương pháp CMIA

3.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit HBsAg của Abbott được sử dụng để định tính kháng nguyên bề mặt viêm gan B trong mẫu huyết thanh hay huyết tương.

Xét nghiệm HBsAg hỗ trợ chẩn đoán nhiễm HBV và được sử dụng như xét nghiệm tầm soát để tránh truyền HBV trong máu, các thành phần của máu, các tế bào, mô và các cơ quan cho người nhận.

3.2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CMIA gồm 2 thì để định tính HBsAg trong huyết thanh và huyết tương người:

- Ở thì đầu, mẫu và các vi hạt có phủ Anti-HBs được kết hợp với nhau. HBsAg hiện diện trong mẫu gắn với các vi hạt phủ Anti-HBs.
- Sau khi rửa, chất liên hợp Anti-HBs gắn acridinium được thêm vào ở bước thứ 2. Sau một chu kỳ rửa khác, các dung dịch Pre-trigger và Trigger được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Phản ứng phát quang hoá học xảy ra được đo theo RLU (đơn vị ánh sáng tương đối). Lượng HBsAg trong mẫu có mối quan hệ trực tiếp với RLU được phát hiện bởi hệ thống quang học miễn dịch.

3.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

3.4. Thực hiện xét nghiệm

3.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: 2-3 ml máu đựng trong ống không chứa chất chống đông hay trong ống có chất kháng đông Potassium EDTA hay Lithium heparin, Sodium heparin, Sodium citrat), mẫu huyết thanh, huyết tương (> 200 µl)
- Việc đảm bảo chất lượng của mẫu bệnh phẩm theo mục 3.3.1 của tài liệu này.

3.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Hệ thống máy miễn dịch Architect i tự động hoàn toàn.
- Sử dụng bộ sinh phẩm HBsAg của hãng Abbott.
- Giếng phản ứng (RV)
- Nắp đậy hóa chất.
- Cốc đựng mẫu (sample cup)
- Dung dịch Pre-Trigger: chứa 1.32% hydrogen peroxide.
- Dung dịch Trigger: chứa 0.35 N sodium hydroxide.
- Dung dịch đệm rửa: chứa dung dịch muối đệm phosphate.
- Dung dịch chuẩn HBsAg (cal 1 và cal 2): Chuẩn bị 275 µl cho mỗi dung dịch chuẩn vào cốc đựng mẫu (cho 2 lần lặp lại).
- Dung dịch chứng HBsAg (Chứng dương, Chứng âm): Chuẩn bị 125 µl cho mỗi dung dịch chứng vào cốc đựng mẫu (cho 2 lần lặp lại).
- Kiểm tra chuẩn:
- Đặt mẫu chuẩn vào vị trí và đặt lệnh hiệu chuẩn hiển thị trên máy xét nghiệm.
- Chạy lặp lại 3 lần mẫu chuẩn 1 và 2.
- Khi đường cong hiệu chuẩn được chấp nhận và lưu lại, không cần thực hiện hiệu chuẩn cho tất cả mẫu xét nghiệm sau đó, trừ khi sử dụng lô thuốc thử mới hay mẫu chứng cho kết quả nằm ngoài khoảng nồng độ.
- Kiểm tra chứng:
- Đặt mẫu chứng vào vị trí và đặt lệnh chạy chứng hiển thị trên máy xét nghiệm
- Kết quả chứng nằm trong khoảng $\pm 2SD$ thì được chấp nhận (giá trị này có in trong tài liệu đi kèm hộp thuốc thử).
- Kết quả được in ra và lưu hồ sơ.

3.4.3. Các bước thực hiện

Bước 1. Nạp mẫu với thể tích huyết thanh tối thiểu là 200 µl.

Bước 2. Nạp bộ thuốc thử HBsAg vào vị trí để thuốc thử trong máy. Bảo đảm tất cả các lọ thuốc thử đều có màng ngăn đậy lại.

Bước 3. Kiểm tra giếng phản ứng, bình chứa nước thải, chất thải rắn và tất cả thuốc thử cần thiết khác. đệm rửa, Trigger, Retrigger,...

Bước 4. Ấn RUN. Hệ thống ARCHITECT i thực hiện các chức năng sau:

- Di chuyển mẫu vào điểm hút.
- Nạp một giếng phản ứng vào quy trình.
- Hút và chuyển mẫu vào giếng phản ứng.
- Nâng RV lên một vị trí và chuyển vi hạt vào RV.
- Thêm chất cộng hợp vào RV.
- Trộn, ủ, và rửa hỗn hợp phản ứng.
- Thêm các dung dịch Pre-Trigger và Trigger.
- Đo cường độ hóa phát quang để xác định lượng HBsAg có trong mẫu
- Hút thành phần của RV vào bình chất thải lỏng và chuyển giếng phản ứng vào bình chất thải rắn.

3.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

3.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Kết quả của phản ứng hóa phát quang được tính bằng đơn vị ánh sáng tương đối (RLU). Sự tương quan trực tiếp giữa lượng Anti-HBs trong mẫu và RLU sẽ được bộ phận quang học trong máy ARCHITECT *i* phát hiện. Sự hiện diện có hay không của Anti-HBs được xác định bằng cách so sánh tín hiệu hóa phát quang trong phản ứng với tín hiệu ngưỡng đã xác định từ đường cong hiệu chuẩn hoạt hóa.

- Xét nghiệm ARCHITECT HBsAg tính toán kết quả dựa trên tỉ lệ RLU mẫu với RLU ngưỡng (S/CO) cho mỗi mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng:

- RLU ngưỡng = (RLU trung bình Chuẩn 1 x 0.0575) + (0.8 x RLU trung bình chuẩn 2).

- $S/CO = RLU \text{ mẫu} / RLU \text{ ngưỡng}$.

3.5.2. Nhận định kết quả:

- Mẫu với giá trị $S/CO < 1.0$: Không phản ứng.
- Mẫu với giá trị $S/CO \geq 1.0$: Có phản ứng.
- Với mục đích chẩn đoán viêm gan cấp hay mãn, kết quả dương tính nên được xem xét mối tương quan với bệnh sử và các dấu ấn viêm gan siêu vi B khác.
- Mẫu không phản ứng không cần xét nghiệm thêm.
- Mẫu có phản ứng phải được lập lại xét nghiệm lần 2, mẫu lập lại lần 2 cũng dương tính, nên được xác định bằng kỹ thuật xét nghiệm HBsAg Confirmation trước khi thông báo tình trạng HBsAg cho bệnh nhân.
- Vùng nghi ngờ (Grayzone) là thông số có thể chỉnh sửa được và nên được sử dụng theo yêu cầu của đơn vị thực hiện xét nghiệm.

3.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm Viêm gan B.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

4. Xác định Anti-HBs bằng phương pháp CMIA

4.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit Anti-HBs của Abbott được sử dụng làm ví dụ để thực hiện xét nghiệm xác định Anti-HBs.

Bộ kit Anti- được sử dụng để xác định nồng độ của kháng thể kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B có trong huyết thanh và huyết tương người.

4.2. Nguyên lý

Kỹ thuật CMIA gồm 2 thì, dùng phương pháp CMIA để định tính Anti-HBs trong huyết thanh và huyết tương người. Ở thì đầu, mẫu và các vi hạt có phủ HBsAg tái tổ hợp (rHBsAg) được kết hợp với nhau. Anti-HBs hiện diện trong mẫu gắn với các vi hạt phủ rHBsAg. Sau khi rửa, chất liên hợp rHBsAg gắn acridinium được thêm vào ở thì thứ 2. Sau một chu kỳ rửa khác, các dung dịch Pre-trigger và Trigger được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Phản ứng phát quang hoá học xảy ra được đo theo RLU (đơn vị ánh sáng tương đối). Lượng Anti-HBs trong mẫu có quan hệ trực tiếp với RLU được phát hiện bởi hệ thống quang học miễn dịch.

4.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

4.4. Thực hiện xét nghiệm

4.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: 2-3 ml máu chứa trong ống không chứa chất chống đông hay trong ống có chất kháng đông Potassium EDTA hay Lithium heparin, Sodium heparin, Sodium citrat), mẫu huyết thanh, huyết tương (> 200 µl).

- Việc đảm bảo chất lượng của mẫu bệnh phẩm theo mục 3.3.1 của tài liệu này.

4.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Hệ thống máy miễn dịch Architect *i* tự động hoàn toàn.
- Sử dụng bộ sinh phẩm Anti-HBs của hãng Abbott hay tương đương.
- Giếng phản ứng (RV).
- Nắp đậy hóa chất.
- Cốc đựng mẫu (sample cup)
- Dung dịch Pre-Trigger: chứa 1.32% hydrogen peroxide
- Dung dịch Trigger: chứa 0.35 N sodium hydroxide
- Dung dịch đệm rửa: chứa dung dịch muối đệm phosphate
- Dung dịch chuẩn Anti-HBs: Chuẩn bị 200 µl cho mỗi dung dịch chuẩn vào cốc đựng mẫu (cho 2 lần lặp lại).
- Dung dịch chứng Anti-HBs (Chứng dương 1, Chứng dương 2, Chứng âm: Chuẩn bị 125 µl cho mỗi dung dịch chứng vào cốc đựng mẫu (cho 2 lần lặp lại).
- Kiểm tra chuẩn:

+ Đặt mẫu chuẩn vào vị trí và đặt lệnh hiệu chuẩn hiển thị trên máy xét nghiệm

+ Chạy lặp lại 3 lần mẫu chuẩn 1 và 2

+ Khi đường cong hiệu chuẩn được chấp nhận và lưu lại, không cần thực hiện hiệu chuẩn cho tất cả mẫu xét nghiệm sau đó, trừ khi sử dụng lô thuốc thử mới hay mẫu chứng cho kết quả nằm ngoài khoảng nồng độ.

+ Kiểm tra chứng:

+ Đặt mẫu chứng vào vị trí và đặt lệnh chạy chứng hiển thị trên máy xét nghiệm

+ Kết quả chứng nằm trong khoảng $\pm 2SD$ thì được chấp nhận (giá trị này có in trong tài liệu đi kèm hộp thuốc thử).

+ Kết quả được in ra và lưu hồ sơ.

4.4.3. Các bước thực hiện

Bước 1. Nạp mẫu với thể tích huyết thanh tối thiểu là 200 μ l

Bước 2. Nạp bộ thuốc thử Anti- HBs vào vị trí để thuốc thử trong máy. Bảo đảm tất cả các lọ thuốc thử đều có màng ngăn đậy lại.

Bước 3. Kiểm tra giếng phản ứng, bình chứa nước thải, chất thải rắn và tất cả thuốc thử cần thiết khác. đệm rửa, Trigger, Retrigger,...

Bước 4. Ấn RUN. Hệ thống ARCHITECT *i* thực hiện các chức năng sau:

- Di chuyển mẫu vào điểm hút.
- Nạp một RV vào quy trình.
- Hút và chuyển mẫu vào RV.
- Nâng RV lên một vị trí và chuyển vi hạt vào RV.
- Thêm chất cộng hợp vào RV.
- Trộn, ủ, và rửa hỗn hợp phản ứng.
- Thêm các dung dịch Pre-Trigger và Trigger.
- Đo cường độ hóa phát quang để xác định lượng Anti-HBs có trong mẫu
- Hút thành phần của RV vào bình chất thải lỏng và chuyển giếng phản ứng vào bình chất thải rắn.

Lưu ý: Mẫu với giá trị Anti-HBs vượt quá 1000 mIU/ml được đánh dấu với mã “>1000 mIU/ml” và có thể được pha loãng nếu cần.

- Quy trình pha loãng tự động (đối với nồng độ đến 15.000 mIU/ml): Hệ thống thực hiện pha loãng mẫu với tỉ lệ 1:15 và tự động tính nồng độ mẫu trước pha loãng và thông báo kết quả.

- Quy trình pha loãng bằng tay (đối với nồng độ đến 100.000 mIU/ml):

- Độ pha loãng được đề nghị cho Anti-HBs là 1:100 (10 μ l: 990 μ l).

- Độ pha loãng không nên vượt quá 1:100.

- Nhập hệ số pha loãng trên màn hình lệnh của bệnh nhân hay chứng. Hệ thống sẽ dùng hệ số pha loãng này để tự động tính nồng độ của mẫu trước pha loãng và đưa ra kết quả.

- Nồng độ được báo cáo phải lớn hơn 10 mIU/ml, nếu < 10 mIU/ml phải pha loãng với độ pha loãng nhỏ hơn.

4.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

4.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm:

Nồng độ Anti-HBs được tính toán dựa vào đường cong hiệu chuẩn lưu lại trên hệ thống sau khi thực hiện hiệu chuẩn.

4.5.2. Nhận định kết quả:

- Mẫu với giá trị nồng độ < 10 mIU/ml được xem là không có phản ứng.
- Mẫu với giá trị nồng độ ≥ 10 mIU/ml được xem là có phản ứng.
- Vùng nghi ngờ (Grayzone) là thông số có thể chỉnh sửa được và nên được sử dụng theo yêu cầu của đơn vị thực hiện xét nghiệm.
- Nếu kết quả Anti-HBs mâu thuẫn với bằng chứng lâm sàng, đề nghị xét nghiệm thêm để xác định kết quả.
- Với mục đích chẩn đoán, kết quả nên được kết hợp với bệnh sử và các dấu ấn viêm gan khác để chẩn đoán nhiễm cấp hay mạn.
- Giá trị định lượng thu được từ việc sử dụng các kỹ thuật khác có thể không tương đương và không thể sử dụng thay thế nhau.
- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

4.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm Viêm gan B.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

5. Xác định HBsAg miễn dịch tự động bằng phương pháp ECLIA

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit HBsAg II của Roche được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho xét nghiệm HBsAg miễn dịch tự động bằng phương pháp ECLIA.

5.1. Phạm vi áp dụng

Bộ kit dùng để định tính kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) trong huyết thanh và huyết tương người.

Phương pháp ECLIA được dùng cho các xét nghiệm miễn dịch Elecsys và Cobas e.

5.2. Nguyên lý

- Bộ kit dựa trên nguyên lý ECLIA.

- Trong thì đầu tiên, hai kháng thể đơn dòng kháng HBsAg đánh dấu Biotin, và hỗn hợp kháng thể đơn dòng kháng HBsAg và kháng thể đa dòng kháng HBsAg đánh dấu phức hợp ruthenium tạo thành phức hợp bất cặp.

- Ở thì thứ hai: sau khi thêm các vi hạt phủ streptavidin, phức hợp miễn dịch trở nên gắn kết với pha rắn thông qua sự tương tác giữa biotin và streptavidin.

- Hỗn hợp phản ứng được chuyển tới buồng đo, ở đó các vi hạt đối từ được bắt giữ trên bề mặt của điện cực. Những thành phần không gắn kết sẽ bị thải ra ngoài buồng đo. Cho điện áp vào điện cực sẽ tạo nên sự phát quang hóa học được đo bằng bộ khuếch đại quang tử.

- Các kết quả được xác định tự động nhờ phần mềm bằng cách so sánh tín hiệu điện hóa phát quang thu được từ sản phẩm phản ứng của mẫu với tín hiệu ngưỡng phản ứng thu được trước đó qua việc chuẩn xét nghiệm.

5.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

5.4. Thực hiện xét nghiệm

5.4.1. Mẫu bệnh phẩm

2-3 ml máu toàn phần Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng Li-heparin, Na-heparin, K2-EDTA

5.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Bộ thuốc thử HBsAg II (Roche).
- Dung dịch rửa hệ thống.
- Mẫu chuẩn âm tính, mẫu chuẩn dương tính (HBsAg Cal1, HBsAg Cal2).
- Các vật tư đi kèm hệ thống máy xét nghiệm.

5.4.3. Các bước thực hiện

Bước 1. Vào Reagent để kiểm tra số lượng test.

Bước 2. Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn

Bước 3. Thực hiện chạy chứng.

Bước 4. Chạy mẫu bệnh phẩm:

- Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng.

- Vào màn hình Workplace. Chọn Test Selection.

- Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm.

- Chọn tên test là HBsAg.

- Vào Barcode Read Error.

- Nhập số rack và vị trí mẫu.

- 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.

- Chọn START ở màn hình Start Conditions.

Lưu ý:

- Các mẫu chuẩn phải đưa về nhiệt độ 20°C - 25°C trước khi đặt trên thiết bị phân tích. Do có khả năng xảy ra các hiệu ứng bay hơi, các mẫu bệnh phẩm và mẫu chuẩn trên các thiết bị phân tích phải được đo trong vòng 2 giờ.

- Thiết bị tự động trộn các vi hạt trước khi sử dụng. Máy đọc thông số đặc hiệu của xét nghiệm trên mã vạch của thuốc thử.

- Cần thực hiện chuẩn mỗi lô thuốc thử sử dụng hoặc hộp thuốc thử mới hoặc sau 28 ngày nếu sử dụng các hộp thuốc thử cùng lô hoặc sau 7 ngày nếu sử dụng cùng hộp thuốc thử đó.

- Để tối ưu hiệu năng xét nghiệm, tuân theo hướng dẫn vận hành của từng hệ thống máy tương ứng. Ví dụ: hệ thống máy Cobas e 6000.

5.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

5.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Mẫu chuẩn dương tính (Khoảng tín hiệu điện hóa phát quang - chỉ số đo được): 3.000 - 11.000.

- Mẫu chuẩn âm tính (Khoảng tín hiệu điện hóa phát quang - chỉ số đo được): 600 - 1.700.

- Máy phân tích tự động tính toán ngưỡng phản ứng dựa trên kết quả đo của mẫu chuẩn âm tính và mẫu chuẩn dương tính.

- Kết quả của một mẫu có thể biểu thị dưới dạng có phản ứng hoặc không có phản ứng cũng như dưới dạng chỉ số ngưỡng (tín hiệu mẫu/ ngưỡng phản ứng) (COI).

5.5.2. Nhận định kết quả:

- Mẫu có chỉ số ngưỡng phản ứng $< 0,9$ là mẫu không có phản ứng. Các mẫu này được xem là âm tính đối với HBsAg và không cần xét nghiệm thêm.

- Mẫu có chỉ số ngưỡng nằm trong khoảng từ $\geq 0,9$ đến $< 1,0$ được xem như mập mé ngưỡng.

- Mẫu có chỉ số ngưỡng $\geq 1,0$ được xem là mẫu có phản ứng.

- Tất cả các mẫu có phản ứng ban đầu hoặc mập mé ngưỡng phải được xét nghiệm lại 2 lần bằng xét nghiệm Elecsys HBsAg II. Nếu giá trị chỉ số ngưỡng $< 0,9$ trong cả 2 trường hợp, mẫu được xem là âm tính với HBsAg. Nếu một trong cả 2 lần tái xét nghiệm có chỉ số ngưỡng $\geq 0,9$ được xem là có phản ứng lặp lại. Các mẫu có phản ứng lặp lại phải được kiểm tra bằng xét nghiệm trung hòa độc lập. Các mẫu được xác định là trung hòa với kháng thể HBs người được xem là dương tính với HBsAs.

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

5.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm Viêm gan B.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

6. Xác định Anti-HBs bằng phương pháp ECLIA

6.1. Phạm vi áp dụng

- Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit Anti-HBs của Roche được sử dụng làm ví dụ để tham khảo.
- Xét nghiệm dùng để định lượng kháng thể của người Anti-HBs (HBsAg) trong huyết thanh và huyết tương người.

6.2. Nguyên lý

Nguyên lý bắt cặp như sau:

- Ở thì đầu tiên: Kháng thể kháng HBs trong mẫu thử HBsAg đánh dấu Biotin và HBsAg đánh dấu phức hợp ruthenium phản ứng với nhau tạo thành phức hợp bắt cặp.
- Ở thì thứ hai: Sau khi thêm các vi hạt phủ streptavidin, phức hợp miễn dịch trở nên gắn kết với pha rắn thông qua sự tương tác giữa biotin và streptavidin.
- Hỗn hợp phản ứng được chuyển tới buồng đo, ở đó các vi hạt đối từ được bắt giữ trên bề mặt của điện cực. Những thành phần không gắn kết sẽ bị thải ra ngoài buồng đo. Cho điện áp vào điện cực sẽ tạo nên sự phát quang hóa học được đo bằng bộ khuếch đại quang tử.

6.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

6.4. Thực hiện xét nghiệm

6.4.1. Mẫu bệnh phẩm

2-3 ml mẫu máu chứa chất chống đông bằng K3-EDTA hoặc các ống chuẩn lấy mẫu máu đông để tách huyết thanh.

6.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Bộ thuốc thử Anti-HBs (Roche).
- Các mẫu chuẩn: Mẫu chuẩn 1, mẫu chuẩn 2.
- Dung dịch rửa và vật tư theo hệ thống máy xét nghiệm.

6.4.3. Các bước thực hiện

Tương tự mục 5.4.3 nhưng chọn test Anti-HBs.

6.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

6.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Chứng dương: có nồng độ < 10 IU/l.
- Chứng âm: có nồng độ ≥ 10 IU/l.
- 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.

- Các kết quả được xác định thông qua một đường chuẩn xét nghiệm trên máy được tạo nên bởi xét nghiệm 2 điểm chuẩn và thông tin đường chuẩn chính qua mã vạch trên hộp thuốc thử.

- 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).

6.5.2. Nhận định kết quả

- Những mẫu có nồng độ < 10 IU/l: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với anti-HBs.

- Những mẫu có nồng độ ≥ 10 IU/l: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với anti-HBs.

- Những mẫu có giá trị ≥ 1000 IU/l thì có thể pha loãng với dung dịch pha loãng bệnh phẩm (Elecsys 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.

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

6.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán xét nghiệm Viêm gan B.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

IV. Tài liệu tham khảo

1. Ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm. Trần Hữu Tâm. Nhà xuất bản y học. 2012.
2. Nội kiểm tra chất lượng xét nghiệm. Trần Hữu Tâm. 2012.
3. Quyết định số 5448/QĐ-BYT ngày 30/12/2014 của Bộ Y tế ban hành Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị bệnh viêm gan vi rút B.
4. Quyết định số 26/QĐ-BYT ngày 03/01/2013 của Bộ Y tế “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh Y học”.
5. Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị các bệnh nhiễm trùng thường gặp. Bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới Thành phố Hồ Chí Minh. Nhà xuất bản y học .Nhà xuất bản Y học. 2016.
6. Liver disease in Viet Nam: screening, surveillance, management and education: a 5-year plan and call to action. Gish RG, Bui TD, Nguyen CT,

Nguyen DT, Tran HV, Tran DM, et al. Journal of gastroenterology and hepatology. 2012;27(2):238-47.

7. www.who.int/mediacentre (10 giờ 33 ngày 18/5/2018).

BỆNH VIÊM GAN C (HEPATITIS C)

Bệnh truyền nhiễm thuộc nhóm B trong Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm.

I. Mô tả chung

Bệnh viêm gan vi rút C (Hepatitis C) hiện nay đang là một vấn đề y tế toàn cầu. Theo ước tính của WHO, tỉ lệ nhiễm vi rút viêm gan C (HCV) trên thế giới khoảng 3,1%, tương đương 170 triệu người, với số nhiễm mới 3-4 triệu người mỗi năm. Tổng chi phí y tế dành cho viêm gan vi rút C dự đoán tăng từ 30 tỷ USD vào năm 2009 lên đến hơn 85 tỷ USD vào năm 2024. Nếu không điều trị, viêm gan vi rút C diễn biến thành biến chứng xơ gan, ung thư gan và có thể dẫn đến tử vong. Tỉ lệ nhiễm HCV dẫn đến xơ gan là 15% - 20% sau 20 năm. Tỷ lệ ung thư gan trên bệnh nhân nhiễm HCV chiếm khoảng 1,4% - 3,3% mỗi năm, trong đó tử vong là 2,6% - 4%. Ở Việt Nam, 5% -10% dân số nhiễm HCV.

Viêm gan vi rút C là một bệnh nguy hiểm vì triệu chứng lâm sàng thường không rõ ràng, 90% trường hợp không có triệu chứng, trong khi đó hậu quả của bệnh để lại thường rất nặng nề. Có 50% - 80% viêm gan vi rút C chuyển thành mạn tính, 20% - 25% bệnh nhân mạn tính diễn tiến qua xơ gan và ung thư gan. Do đó, xác định chính xác tác nhân HCV là một mục tiêu quan tâm hàng đầu của các bác sĩ.

Phương pháp xét nghiệm vi rút viêm gan C trong nội dung hướng dẫn này chỉ bao gồm 02 phương pháp xét nghiệm được dùng phổ biến trong hệ thống xét nghiệm y tế dự phòng: (1) phương pháp xét nghiệm sắc ký miễn dịch, (2) phương pháp miễn dịch đánh dấu (ELISA, ECLIA, CMIA). Các kỹ thuật khác tham khảo thêm trong Quyết định 26/QĐ-BYT ngày 03/01/2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc ban hành tài liệu “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành vi sinh y học”.

II. Yêu cầu chung

1. Nhân sự

- Có ít nhất 02 cán bộ có chuyên môn phù hợp và đã được đào tạo về các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán viêm gan C.

- Các cán bộ cần được đào tạo về cách sử dụng trang thiết bị, thực hành an toàn sinh học (ATSH), thực hành vi sinh chuẩn, và đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Các cán bộ PXN được đào tạo sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

- Nhân viên mới sau khi đánh giá có kết quả đạt, cần tiếp tục được giám sát ít nhất 3 - 6 tháng trước khi chính thức được thực hiện xét nghiệm độc lập.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả xét nghiệm là cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học, có kinh nghiệm công tác trong lĩnh vực xét nghiệm từ 3 năm trở lên.

- Cán bộ PXN được kiểm tra sức khỏe định kỳ tối thiểu 1 lần hàng năm.

2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị

2.1. Cơ sở vật chất

- PXN cần đáp ứng về điều kiện ATSH, hệ thống quản lý chất lượng PXN theo quy định hiện hành. Các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán phát hiện HCV được áp dụng tại PXN ATSH cấp II trở lên.

2.2. Trang thiết bị

Bảng 1: Trang thiết bị

Tên thiết bị	Xét nghiệm nhanh	ELISA	ECLIA	CMIA
Dàn ELISA		1 bộ		
Máy miễn dịch tự động Cobas e601			1 bộ	
Máy miễn dịch tự động Architect				1 bộ
Pi pét 1 kênh (1 -50 µl, 50-200 µl, 1000µl)	1 bộ	1 bộ	1 bộ	1 bộ
Tủ lạnh 2°C - 8°C (bảo quản mẫu)	1 cái	1 cái	1 cái	1 cái
Tủ lạnh 2°C - 8°C (bảo quản sinh phẩm)		1 cái	1 cái	1 cái
Tủ ATSH phù hợp		1 cái		
Nồi hấp ưót		1 cái	1 cái	1 cái
Máy ly tâm	1 cái	1 cái	1 cái	1 cái
Máy vortex		1 cái		

- Hồ sơ thiết bị gồm: Hồ sơ lắp đặt thiết bị, lý lịch thiết bị, hướng dẫn sử dụng, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Hồ sơ đào tạo sử dụng trang thiết bị cho các nhân viên vận hành thiết bị.

3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm

3.1. Trước xét nghiệm

3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu

- Loại mẫu: mẫu máu không chống đông 2-4 ml, huyết thanh.

- Điều kiện bảo quản vận chuyển: theo quy định hiện hành và hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Tiêu chuẩn chấp nhận: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, đủ lượng mẫu, kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hoặc phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Tiêu chuẩn từ chối:

- + Bị bất hoạt do nhiệt, bị trộn lẫn, bị tán huyết mạnh, bị nhiễm khuẩn.
- + Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.2 về hủy mẫu tại hướng dẫn này.

3.1.2. **Hiệu chuẩn, hiệu chỉnh máy móc/trang thiết bị**

Tất cả các trang thiết bị cần thực hiện việc hiệu chuẩn, hiệu chỉnh, bảo dưỡng theo quy định.

3.1.3. **Kiểm tra chất lượng hóa chất sinh phẩm và vật tư tiêu hao**

- Hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định và còn hạn sử dụng.

- Có hồ sơ theo dõi sử dụng sinh phẩm, hóa chất vật tư tiêu hao.

- Cần có hồ sơ đánh giá, kiểm soát chất lượng sinh phẩm, hóa chất.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

Các loại sinh phẩm khi nhận về đều phải được kiểm tra.

Quan sát bằng mắt thường xem các lọ hoá chất, sinh phẩm có bất thường không, ví dụ như bột nắp, rò rỉ, vẩn đục, thay đổi màu sắc.

Kiểm tra mỗi lô sinh phẩm theo bộ mẫu gồm 1 mẫu dương và 1 mẫu âm của tác nhân mà PXN đang thực hiện theo quy trình xét nghiệm.

Pha chế sinh phẩm phải luôn được đặt trong khay giữ lạnh và cất lại ngay sau khi dùng xong.

- Đảm bảo sự sẵn có về vật tư hóa chất cho việc thực hiện xét nghiệm.

3.2. **Trong xét nghiệm**

3.2.1. **Nội kiểm**

Đối với xét nghiệm nhanh nên thực hiện mẫu nội kiểm độc lập khi mở hộp. Trong đó:

- Chứng âm: mẫu cho kết quả âm tính đối với phương pháp đo tải lượng vi rút viêm gan C.

- Chứng dương: mẫu có tải lượng vi rút viêm gan C $> 10^3$ copies/mL.

Đối với xét nghiệm ELISA: sử dụng các mẫu chứng theo bộ sinh phẩm và mẫu nội kiểm nếu có.

Đối với xét nghiệm ECLIA và CMIA: sử dụng các mẫu chứng theo bộ sinh phẩm do nhà sản xuất cung cấp.

3.2.2. **Đánh giá từ bên ngoài**

Tham gia đánh giá từ bên ngoài (ngoại kiểm, liên phòng hoặc PXN tham chiếu) và thực hiện hành động khắc phục khi kết quả không đạt.

3.3.Sau xét nghiệm

3.3.1. Bảo quản và lưu trữ mẫu bệnh phẩm

- Trong trường hợp cần thiết, mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được lưu trong tủ lạnh (từ -70°C hoặc thấp hơn).
- Sau khi cất mẫu vào hộp nhân viên PXN ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào sổ lưu giữ mẫu.
- Tất cả các mẫu bệnh phẩm được xếp vào hộp theo thứ tự từng năm và có sổ lưu giữ mẫu và sơ đồ tủ lưu giữ.
- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

3.3.2. Tiêu hủy bệnh phẩm

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:
 - Mẫu bệnh phẩm bị từ chối (không đạt tiêu chuẩn).
 - Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ.
- Cho bệnh phẩm cần hủy vào túi rác thải y tế, buộc miệng túi. Sử dụng túi nhựa hấp được, không bị rò rỉ, có quy định màu sắc, ký hiệu rõ ràng trên túi để đựng mẫu
- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.
- Hấp ướt tại 121°C trong 30 phút.
- Sau khi hoàn tất, kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt, các thông số trên máy đạt và lấy túi rác thải.
- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.
- Lập biên bản hủy mẫu theo quy định đảm bảo ATSH.

Lưu ý: lò hấp phải được thẩm định định kỳ bằng chỉ thị sinh học và/hoặc chỉ thị hóa học cấp độ phù hợp.

4. Đọc và đánh giá kết quả

- Kết quả cần được kiểm giám sát và đánh giá bởi ít nhất 2 người và phải được lưu dưới dạng văn bản và trong máy tính.
- Phải kiểm tra các kết quả của mẫu chứng thỏa mãn điều kiện (tùy theo phương pháp áp dụng) mới tiến hành đánh giá kết quả trên mẫu bệnh phẩm xét nghiệm.
- Nếu chứng không đạt thì không được đánh giá kết quả xét nghiệm của mẫu bệnh phẩm mà phải thực hiện lại xét nghiệm; cần tiến hành kiểm tra lại quá trình xét nghiệm bắt đầu từ khâu chuẩn bị, tình trạng của mẫu chứng để tìm hiểu rõ nguyên nhân cần khắc phục.
- Có quy định cụ thể cho trả kết quả cho các trường hợp thường quy, kết quả bất thường/ báo động, khẩn, tạm thời và quy trình xử lý khi trả kết quả nhầm, chậm.

5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm

5.1. Lập kế hoạch bố trí thử nghiệm:

- Kế hoạch bao gồm: Người chuẩn bị mẫu, người thực hiện, người đánh giá kết quả; tiêu chuẩn đánh giá; thời gian chuẩn bị mẫu, cách thức chuẩn bị mẫu; các bước tiến hành xét nghiệm, báo cáo kết quả; phê duyệt kết quả xét nghiệm.

- Cần xác định từng phương pháp định tính/định lượng hoặc bán định lượng để xác định giá trị sử dụng cho từng phương pháp.

- Đối với mỗi phương pháp xét nghiệm khi bắt đầu được áp dụng tại PXN mà không có bất kỳ sự thay đổi nào về phương pháp và loại mẫu sẽ tiến hành xác định 03 chỉ tiêu kỹ thuật cơ bản: độ chính xác (accuracy), độ đặc hiệu (specificity), độ chụm (precision). Yêu cầu mỗi đợt thẩm định được lặp lại ít nhất 3 lần để tính độ chụm.

- Cỡ mẫu cần phải được tính toán cẩn thận để nghiên cứu thẩm định có độ tin cậy cao và có ý nghĩa thống kê. Đối với xét nghiệm định tính thì làm độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng. Theo CSI tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm. Đối với xét nghiệm định lượng thực hiện độ chính xác, độ chụm, LOD, LOQ, khoảng tuyến tính (nếu có), các thông số ảnh hưởng. Cần tối thiểu 20 điểm dữ liệu. Đối với xét nghiệm bán định lượng thực hiện độ chụm, LOD, độ nhạy, độ đặc hiệu.

Bảng 2: Bảng xác nhận giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm

Chỉ số	Số lượng mẫu bệnh phẩm /lặp
Độ chính xác	20/1
Giới hạn phát hiện (LOD)	2/10
Độ lặp	1/10
Độ tái lặp	1/20
Độ nhạy/độ đặc hiệu	20/1

5.2. Độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chụm

- Độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu

Bố trí thực hiện bộ mẫu đã được xác định kết quả bằng quy trình tiêu chuẩn hoặc kiểm tra lại kết quả bằng chương trình so sánh liên phòng.

Thực hiện xét nghiệm như đối với các mẫu của bệnh nhân.

Bảng 3: Đọc đánh giá xét nghiệm

Kết quả tại PXN	Kết quả của quy trình tiêu chuẩn	
	Dương tính	Âm tính
Dương tính	a	b
Âm tính	c	d

Tính toán số liệu:

- + Độ chính xác (Accuracy) = $(a+d)/N$
- + Độ đặc hiệu (Specificity) = $d/(c+d)$
- + Độ nhạy (Sensitivity) = $a/(a+b)$
- + Giá trị tiên đoán dương tính (Positive Predictable Value) = $a/(a+c)$
- + Giá trị tiên đoán âm tính (Negative Predictable Value) = $d/(b+d)$
- + Trong đó: $N = a + b + c + d$ tổng số kết quả xét nghiệm.

- Độ chum (gồm độ lặp và độ tái lặp)

Độ lặp: thực hiện 10 lần trên mẫu thực với cùng một điều kiện về con người, sinh phẩm và thiết bị.

Độ tái lặp: thực hiện 20 lần trên mẫu thực với cùng một điều kiện về sinh phẩm và thiết bị nhưng thay đổi về con người, thời gian.

Xét nghiệm sắc ký miễn dịch: thực hiện độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên lượng. Theo CSI tối thiểu 20 mẫu âm và 20 mẫu dương cho xét nghiệm.

Xét nghiệm ELISA, ECLIA (bán định lượng): thực hiện độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chum, giới hạn phát hiện (LOD).

Xét nghiệm CMIA (định lượng): thực hiện độ chính xác, độ chum, LOD, LOQ (ngưỡng định lượng), khoảng tuyến tính (nếu có), các thông số ảnh hưởng. Cần tối thiểu 20 điểm dữ liệu cho mỗi chỉ số đánh giá.

5.3.Đánh giá kết quả

Việc xác nhận giá trị sử dụng phương pháp được kết luận là đạt khi:

- Độ nhạy, độ đặc hiệu lớn hơn hoặc bằng giá trị của quy trình tiêu chuẩn hoặc tiêu chuẩn tham chiếu

- Tỷ lệ dương tính giả, âm tính giả nhỏ hơn hoặc bằng giá trị của quy trình tiêu chuẩn.

- Độ chum: So sánh với độ lệch chuẩn lặp lại, tái lặp do nhà sản xuất cung cấp. Độ lệch chuẩn thực nghiệm cần nhỏ hơn hoặc bằng độ lệch chuẩn công bố hoặc kết quả hệ số biến thiên $CV < 10\%$.

- LOD, LOQ, khoảng tuyến tính: Công bố ngưỡng phát hiện, ngưỡng định lượng và khoảng tuyến tính thực tế tại phòng xét nghiệm. Đánh giá, nhận xét bằng cách so sánh với thông tin được công bố bởi nhà sản xuất.

5.4. Xem xét định kỳ phương pháp xét nghiệm

- Cần xem xét tính hiệu quả của phương pháp xét nghiệm định kỳ hàng năm thông qua các tiêu chí kỹ thuật: Độ tái lập (tổng hợp từ kết quả kiểm tra chất lượng trong năm), Kết quả tham gia ngoại kiểm, Lỗi hệ thống (áp dụng cho các phương pháp có sử dụng thiết bị). Nếu có yêu cầu thêm về tiêu chí kỹ thuật khác thì phải ghi rõ vào bản báo cáo kết quả. Nếu không có yêu cầu đặt biệt, các tiêu chí kỹ thuật trên có thể bố trí giống như thẩm định phương pháp ban đầu.

- Lưu hồ sơ tất cả các bước thực hiện trên bao gồm các bảng tổng hợp kết quả.

III. Phương pháp xét nghiệm

Các phương pháp xét nghiệm:

- Xác định kháng thể HCV bằng phương pháp xét nghiệm sắc ký miễn dịch.
- Xác định kháng thể HCV bằng phương pháp xét nghiệm đánh dấu gắn enzyme.
- Xác định kháng thể HCV bằng phương pháp xét nghiệm đánh dấu điện hóa phát quang.
- Xác định HCV Core Ag bằng phương pháp miễn đánh dấu hóa phát quang

1. Xác định kháng thể HCV bằng phương pháp xét nghiệm sắc ký miễn dịch (SD BIOLINE HCV)

Trong nội dung hướng dẫn này định hướng cách sử dụng các bộ kit thương mại SD BIOLINE HCV để tham khảo cho xét nghiệm sắc ký miễn dịch, là phương pháp xét nghiệm đơn giản không yêu cầu nhiều về máy móc trang thiết bị, có thể thực hiện được tại các cơ sở y tế tuyến huyện và các phòng khám nhỏ.

1.1. Phạm vi áp dụng

Phương pháp xét nghiệm miễn dịch sắc ký phát hiện kháng thể vi rút viêm gan C trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

1.2. Nguyên lý

Nguyên lý sắc ký miễn dịch phát hiện định tính kháng thể đặc hiệu HCV trong huyết thanh bệnh nhân. Trong đó nguyên liệu bắt giữ là kháng nguyên tái tổ hợp gồm: protein lõi, NS3, NS4, NS5 (thế hệ 3).

1.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

1.4. Thực hiện xét nghiệm

1.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần.
- Thể tích bệnh phẩm dùng trong xét nghiệm: 10 µl huyết thanh huyết tương hoặc 20µl với mẫu máu toàn phần.

Tách huyết thanh đối với bệnh phẩm máu

- Sau khi lấy máu, để ổn định 30 phút ở nhiệt độ phòng, tiến hành tách huyết thanh/huyết tương. Trong trường hợp không tách được huyết tương/huyết thanh ngay sau khi lấy máu, để ổn định ở nhiệt độ phòng 30 phút sau đó bảo quản ở nhiệt độ 2°C - 8°C và cần phải tách huyết thanh ngay trong vòng 24 giờ.

- Sử dụng máy ly tâm phải thăng bằng các tuýp nghiệm trước khi ly tâm. Tiến hành ly tâm tốc độ 2000 - 2500 vòng/phút trong vòng 10 phút. Tách phần huyết thanh, huyết tương vào một tuýp nhựa rồi đóng chặt nắp.

- Không có máy ly tâm: Để tuýp trên giá trong 2 giờ, sau đó tách huyết thanh/huyết tương cho vào một tuýp nghiệm nhựa rồi đóng chặt nắp.

Lưu ý: Bảo quản mẫu huyết thanh ở 2°C - 8°C trong vòng 7 ngày. Nếu chưa xét nghiệm ngay, bảo quản mẫu ở -20°C hoặc âm sâu hơn. Không làm tan mẫu quá 3 lần. Sau khi làm tan, phải trộn đều mẫu trước khi xét nghiệm.

1.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Bộ kit được bảo quản theo quy định của nhà sản xuất.
- Pi pét và đầu tip phù hợp (10-200 µl).

1.4.3. Các bước thực hiện

Quy trình thực hiện có thể thay đổi tùy theo mỗi kit thương mại, cơ bản bao gồm các bước sau:

Bước 1. Để mẫu xét nghiệm và mẫu nội kiểm đạt ở nhiệt độ phòng (trong khoảng 30 phút) trước khi xét nghiệm.

Bước 2. Lấy số lượng test ứng với số lượng mẫu cần xét nghiệm, để ổn định ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút.

Bước 3. Mở bao bì của test, dùng bút ghi mã số mẫu xét nghiệm lên từng test và tra mẫu vào giếng xét nghiệm .

Bước 4. Dùng pi pét hút 10µl huyết thanh huyết tương hoặc 20 µl mẫu máu toàn phần mẫu nhỏ vào giếng mẫu.

Bước 5. Bấm đồng hồ 20 phút, đợi đọc kết quả sau 20 phút.

1.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

1.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

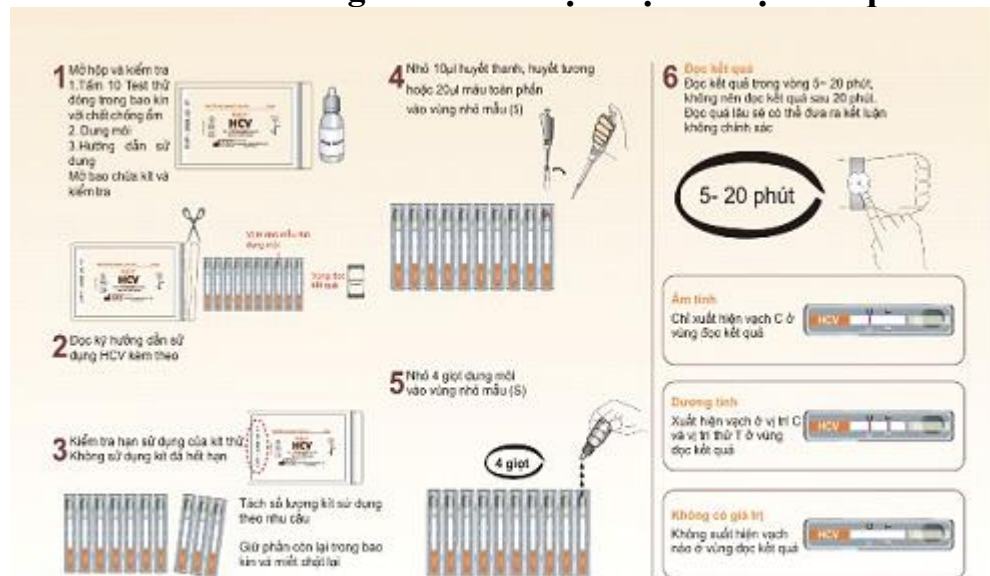
- Chỉ đọc kết quả khi vị trí C có hiện vạch. Nếu vị trí C không có hiện vạch thì phải làm lại xét nghiệm với test khác.
- Mẫu có vạch ở vị trí C và có vạch ở vị trí T: Mẫu dương tính với kháng thể HCV.

- Mẫu có vạch ở vị trí C và không có vạch ở vị trí T: Mẫu âm tính với kháng thể HCV.

1.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Mẫu dương tính: Có vạch ở vị trí C và T.
- Mẫu âm tính: Có vạch ở vị trí C và không có vạch ở vị trí T.

Hình 1: Hướng dẫn cách thực hiện và đọc kết quả



- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

1.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

2. Xác định kháng thể HCV bằng phương pháp xét nghiệm ELISA (Murex HCV 4.0)

2.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit Murex HCV 4.0 được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho phương pháp xét nghiệm ELISA phát hiện kháng thể vi rút viêm gan C trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

2.2. Nguyên lý

Mẫu pha loãng được ủ trong giếng có gắn kháng nguyên tinh chế vùng lõi, NS3, NS4, NS5 của HCV. Với nguyên lý sandwich 2 lần xét nghiệm miễn dịch

gắn enzyme Murex Anti-HCV 4.0 phát hiện kháng thể vi rút viêm gan C có trong mẫu bệnh nhân.

2.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH cấp II theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

2.4. Thực hiện xét nghiệm

2.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu: huyết thanh, huyết tương.
- Thể tích bệnh phẩm dùng trong xét nghiệm: 20 μ l.

Tách huyết thanh đối với bệnh phẩm máu:

- Sau khi lấy máu, để ổn định 30 phút ở nhiệt độ phòng, tiến hành tách huyết thanh/huyết tương. Trong trường hợp không tách được huyết tương/huyết thanh ngay sau khi lấy máu, để ổn định ở nhiệt độ phòng 30 phút sau đó bảo quản ở nhiệt độ 2°C - 8°C và cần phải tách huyết thanh ngay trong vòng 24 giờ.

- Sử dụng máy ly tâm phải thăng bằng các tuýp trước khi ly tâm. Tiến hành ly tâm tốc độ 2.000 - 2.500 vòng/phút trong vòng 10 phút. Tách phần huyết thanh, huyết tương vào một tuýp nhựa rồi đóng chặt nắp.

- Không có máy ly tâm: Để tuýp trên giá trong 2 giờ, sau đó tách huyết thanh/huyết tương cho vào một tuýp nhựa rồi đóng chặt nắp.

Lưu ý: Bảo quản mẫu huyết thanh ở 2°C - 8°C trong vòng 7 ngày. Nếu chưa xét nghiệm ngay, bảo quản mẫu ở -20°C hoặc âm sâu hơn. Không làm tan mẫu quá 3 lần. Sau khi làm tan, phải trộn đều mẫu trước khi xét nghiệm.

2.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Chuẩn bị hoá chất: Murex HCV 4.0.
- Cơ chất: 1R9:1R8 cất trong tối sử dụng trong vòng 6h nhiệt độ phòng.
- Dung dịch rửa: 1R2: 19 nước cất, cất ở 2-30°C sử dụng trong vòng 2 tuần.

2.4.3. Các bước tiến hành

Bước 1. Chuẩn bị sơ đồ giếng tra mẫu.

Bước 2. Lấy số thanh giếng phù hợp với số mẫu cần xét nghiệm ra khỏi túi.

Bước 3. Cho 180 μ l dung dịch pha loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng.

Bước 4. Cho 20 μ l mẫu xét nghiệm lần lượt vào các giếng C1, D1... trộn đều.

Bước 5. Cho 20 μ l huyết thanh chứng âm vào giếng A1 trộn đều.

Bước 6. Cho 20 μ l huyết thanh chứng dương vào giếng B1 trộn đều.

Bước 7. Ủ 60 phút trong máy ủ 37°C.

Bước 8. Rửa 5 lần không ngâm.

Bước 9. Cho 100 μ l dung dịch chất cộng hợp. Ủ 30 phút ở 37°C.

Bước 10. Rửa 5 lần không ngâm.

Bước 11. Cho 100 μ l dung dịch cơ chất (1R8.1R9) ủ tối 30 phút 37°C.

Bước 12. Dùng phản ứng bằng 50 μ l dung dịch R10.

Bước 13. Đọc bước sóng 450/620 nm trong vòng 15 phút sau khi cho dung dịch dừng phản ứng R10.

2.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

2.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm:

Việc khẳng định sự có mặt kháng thể HCV của mẫu được so sánh với giá trị ngưỡng $C.O = OD_{NC} + 0.6$. Kết quả chấp nhận được khi:

- Giá trị chứng dương (PC) > 0.8
- Giá trị chứng âm (NC) < 0.25

2.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Âm tính nếu $OD_{mẫu} < C.O$
- Dương tính nếu $OD_{mẫu} > C.O$
- Làm lại nếu $C.O - 10\% < OD_{mẫu} \leq C.O$.
- Nếu lần 2 hoặc lần 3 có $OD \geq CO$, mẫu được coi là dương tính.
- Nếu 2 lần đều có $OD < CO$, mẫu được coi là âm tính.
- Nếu lần 2 hoặc lần 3 mẫu vẫn ở vùng phải xét nghiệm lại, làm bổ sung bằng các xét nghiệm khác.
- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

2.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

3. Xác định kháng thể HCV bằng phương pháp xét nghiệm ECLIA

3.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit của máy tự động được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho phương pháp ECLIA phát hiện kháng thể vi rút viêm gan C trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

3.2. Nguyên lý

Nguyên lý: mẫu thử, thuốc thử chứa kháng nguyên đặc hiệu HCV đánh dấu biotin và thuốc thử chứa kháng nguyên đặc hiệu đánh dấu phức hợp ruthenium phản ứng với nhau tạo thành phức hợp bắt cặp. Với nguyên lý bắt cặp xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang Anti-HCV phát hiện kháng thể vi rút viêm gan C có trong mẫu bệnh nhân.

3.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH cấp II theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

3.4. Thực hiện xét nghiệm

3.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu: huyết thanh, huyết tương.

- Thể tích bệnh phẩm dùng trong xét nghiệm: 50 μ l.

Tách huyết thanh đối với bệnh phẩm máu:

- Sau khi lấy máu, để ổn định 30 phút ở nhiệt độ phòng, tiến hành tách huyết thanh/huyết tương. Trong trường hợp không tách được huyết tương/huyết thanh ngay sau khi lấy máu, để ổn định ở nhiệt độ phòng 30 phút sau đó bảo quản ở nhiệt độ 2°C - 8°C và cần phải tách huyết thanh ngay trong vòng 24 giờ.

Lưu ý: Bảo quản mẫu huyết thanh ở 2°C - 8°C trong vòng 7 ngày. Nếu chưa xét nghiệm ngay, bảo quản mẫu ở -20°C hoặc âm sâu hơn. Không làm tan mẫu quá 3 lần. Sau khi làm tan, phải trộn đều mẫu trước khi xét nghiệm.

3.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

Bộ thuốc thử M, R1, R2 được dán nhãn A-HCV, A-HCV Cal1, A-HCV Cal2.

3.4.3. Các bước tiến hành

Bước 1. Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu vào sample cup tương ứng.

Bước 2. Vào màn hình Workplace → Test Selection.

Bước 3. Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm.

Bước 4. Chọn tên test là AntiHCV.

Bước 5. Vào Barcode Read Error.

Bước 6. Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save.

Bước 7. Đặt mẫu huyết thanh người bệnh cần chạy vào Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.

Bước 8. Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions.

3.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

3.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên số đo của Cal1 và Cal2. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

3.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- 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

- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

3.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

4. Xác định HCV Core Ag bằng phương pháp xét nghiệm CMIA

4.1. Phạm vi áp dụng

Trong nội dung hướng dẫn này bộ kit Architect HCV Ag được sử dụng làm ví dụ để tham khảo cho phương pháp CMIA phát hiện và định lượng kháng nguyên vi rút viêm gan C trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

4.2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CMIA với quy trình xét nghiệm linh hoạt Chemiflex.

4.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về ATSH cấp II theo quy định hiện hành đảm bảo không lây nhiễm cho con người và ra môi trường.

4.4. Thực hiện xét nghiệm

4.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu: huyết thanh, huyết tương
- Thể tích bệnh phẩm dùng trong xét nghiệm: 158 μ l

Tách huyết thanh đối với bệnh phẩm máu: Sau khi lấy máu, để ổn định 30 phút ở nhiệt độ phòng, tiến hành tách huyết thanh/huyết tương. Trong trường hợp không tách được huyết tương/huyết thanh ngay sau khi lấy máu, để ổn định ở nhiệt độ phòng 30 phút sau đó bảo quản ở nhiệt độ 2 °C -8°C và cần phải tách huyết thanh ngay trong vòng 24 giờ.

Lưu ý: Bảo quản mẫu huyết thanh ở 2°C - 8°C trong vòng 7 ngày. Nếu chưa xét nghiệm ngay, bảo quản mẫu ở -20°C hoặc âm sâu hơn. Không làm tan mẫu quá 3 lần. Sau khi làm tan, phải trộn đều mẫu trước khi xét nghiệm.

4.4.2. Sinh phẩm hóa chất, vật tư tiêu hao

Bộ thuốc thử Architect HCV Ag, dung dịch phản ứng, dung dịch tiền phản ứng, dung dịch rửa, cồng phản ứng, cốc đựng mẫu, màng ngăn, nắp thay thế.

4.4.3. Các bước tiến hành

Bước 1. Máy ở chế độ READY. Nạp bộ thuốc thử ARCHITECT HCV Ag vào hệ thống

- 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 đặt lại.

Bước 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.

Bước 3. Vào Supply → Supply Status kiểm tra các vật tư tiêu hao và dung dịch chạy máy.

Bước 4. Chuyển máy sang chế độ RUNNING.

Bước 5. Cho trực tiếp tuýp máu vào Sample Carrier.

Bước 6. Vào màn hình Order → Patient Order.

Bước 7. Nhập mã Carrier, mã bệnh phẩm.

Bước 8. Chọn Test HCV Ag.

Bước 9. Chọn Add Order.

Bước 10. Đưa Carrier vào bộ phận nạp mẫu trên máy.

4.5. Phiên giải kết quả

4.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

Xét nghiệm ARCHITECT 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.

4.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- 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.
- Việc xem xét, phê duyệt kết quả được thực hiện bởi người có thẩm quyền.

4.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo.

IV. Tài liệu tham khảo

1. Cao Minh Nga và cs (2005), "Tình trạng nhiễm HCV, HIV, HBV và Lao trên các đối tượng nghiện ma túy", *Y học TP. Hồ Chí Minh*, Tập 9 (số 1), tr. 73-78.
2. Global Burden of Hepatitis C working group (2004), "Global burden of disease (GBD) for hepatitis C", *Clin Pharmacol*, 44 (1), pp.20-29.
3. Hướng dẫn sử dụng đi kèm các bộ kit.
4. Hồ Tân Đạt và cs (2006), "Kiểu gen của siêu vi viêm gan C ở Việt Nam", *Y Học TP. Hồ Chí Minh*, số 10, tr. 28 -34.
5. Lesens O, Steben M, Bélanger G, Tsoukas CM, et al. (1999), "Hepatitis C virus is related to progressive liver disease in human immunodeficiency virus-positive hemophiliacs and should be treated as an opportunistic infection", *J Infect Dis*, 179(5), pp. 1254-1258.

6. Lothar Thomas (1999), *Clinical Laboratory Diagnostics, Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*, TH-Books, pp. 1273-1278.
7. Milliman (2009), *Consequenceces of hepatitis C virus (HCV): costs of a baby boomer epidemic of liver disease*.
8. Vincent Soriano, Jens Lundgren, et al. (2008), "Spontaneous Viral Clearance, Viral Load, and Genotype Distribution of Hepatitis C Virus (HCV) in HIV-Infected Patients with Anti-HCV Antibodies in Europe", *The journal of Infectious Diseases*, 198, pp.1337-44.
9. Võ Minh Quang và cs (2009), "Các yếu tố dịch tễ, lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân viêm gan siêu vi C điều trị tại bệnh viện Bệnh nhiệt đới TP.HCM - Năm 2006-2007", *Y Học TP. Hồ Chí Minh*, số 13, tr. 268-273.
10. WHO (2017), *Hepatitis C*