

BỘ Y TẾ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Số: /QĐ-BYT

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

QUYẾT ĐỊNH

**Về việc ban hành tài liệu chuyên môn
“Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 2”**

BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

Căn cứ Luật Khám bệnh, chữa bệnh năm 2023;

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

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

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

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

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Ban hành kèm theo Quyết định này Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 2”, gồm 29 quy trình kỹ thuật.

Điều 2. Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 2” được áp dụng tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh từ ngày 01 tháng 07 năm 2026.

Điều 3. Các ông, bà: Chánh Văn phòng Bộ, Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh, Cục trưởng, Vụ trưởng các Cục, Vụ thuộc Bộ Y tế; Giám đốc các bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế; Giám đốc Sở Y tế các tỉnh, thành phố trực thuộc trung ương; Thủ trưởng Y tế các ngành và các cơ quan, đơn vị liên quan chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Bộ trưởng (để báo cáo);
- Các Thứ trưởng;
- BHXHVN - Bộ Tài chính;
- Cổng thông tin điện tử Bộ Y tế;
- Website Cục QLKCB;
- Lưu: VT, KCB.

**KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG**

Trần Văn Thuấn



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ VI SINH - TẬP 2

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

Hà Nội, 2025

Chỉ đạo biên soạn, thẩm định

GS.TS. Trần Văn Thuấn

Thứ trưởng Bộ Y tế

TS. Hà Anh Đức

Cục trưởng Cục QLKCB - Bộ Y tế

Chủ biên

PGS. TS. Đào Xuân Cơ

Giám đốc Bệnh viện Bạch Mai

TS. Vương Ánh Dương

Phó Cục trưởng Cục QLKCB

PGS.TS. Nguyễn Tuấn Tùng

Phó Giám đốc Bệnh viện Bạch Mai

TS. Trương Thái Phương

Trưởng khoa Vi sinh - Bệnh viện Bạch Mai

BSCKII. Lê Thị Ngân

Phó Trưởng khoa Vi sinh - Bệnh viện Bạch Mai

PGS.TS. Đoàn Mai Phương

Nguyên Trưởng khoa Vi sinh - Bệnh viện Bạch Mai

Tham gia biên soạn, thẩm định

PGS.TS. Phạm Hồng Nhung

Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Nguyễn Ngọc Diệp

Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Phạm Thị Thảo Hương

Bệnh viện Bạch Mai

TS. Nguyễn Thị Tuyết Mai

Bệnh viện Bạch Mai

BSCKII. Nguyễn Sâm

Bệnh viện Bạch Mai

CN. Trần Minh Tuấn

Bệnh viện Bạch Mai

TS. Nguyễn Văn An

Bệnh viện Quân Y 103

ThS. Lê Hoài Cường

Bệnh viện Chợ Rẫy

ThS. Lê Trung Dũng

Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Nguyễn Mỹ Hạnh

Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương

TS. Phạm Quỳnh Hoa

Bệnh viện Da liễu Trung ương

TS. Lê Nguyễn Minh Hoa

Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương

BSCKII. Nguyễn Thị Lan
Hương

Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Vũ Thị Huyền

Bệnh viện Nhi Trung ương

TS. Nguyễn Trọng Khoa

Phó Cục trưởng Cục QLKCB

ThS. Nguyễn Tuấn Linh

Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Lê Phương Mai

Bệnh viện Chợ Rẫy

ThS. Đỗ Thị Lê Na

Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương

TS. Hoàng Thị Bích Ngọc

Bệnh viện Nhi Trung ương

ThS. Trương Lê Vân Ngọc

Cục QLKCB – Bộ Y tế

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

LỜI NÓI ĐẦU

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

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

Bộ Y tế đã thành lập Hội đồng chuyên môn nghiệm thu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh với sự tham gia của đại diện một số vụ, cục chức năng của Bộ Y tế, các chuyên gia hàng đầu về vi sinh. Các thành viên chuyên môn đã làm việc với tinh thần trách nhiệm, đóng góp về thời gian, trí tuệ, kinh nghiệm để góp ý, nghiệm thu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật. **“Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 2”** được xây dựng cho các kỹ thuật có trong Phụ lục số 02 và không có trong Phụ lục số 01 (của Thông tư số 23/2024/TT-BYT ngày 18 tháng 10 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành danh mục kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh), đã được Hội đồng chuyên môn nghiệm thu và được Bộ Y tế ban hành với **tổng số 29 quy trình kỹ thuật và được áp dụng tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh từ ngày 01 tháng 7 năm 2026.**

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

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

Xin trân trọng cảm ơn!

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

NGUYÊN TẮC ÁP DỤNG HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT

1. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật được xây dựng và ban hành theo từng chương, chuyên ngành; bao gồm các quy định về chỉ định, chống chỉ định, thận trọng, chuẩn bị thực hiện kỹ thuật, đến các bước thực hiện theo trình tự từ khi bắt đầu đến khi kết thúc thực hiện kỹ thuật.
2. Tài liệu chuyên môn Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 2 được xây dựng và ban hành cho các kỹ thuật có trong Phụ lục số 02 và không có trong Phụ lục số 01 Thông tư số 23/2024/TT-BYT ngày 18 tháng 10 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành danh mục kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh. Tài liệu chuyên môn này được áp dụng tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh từ ngày 01 tháng 7 năm 2026.
3. Quy định về thời gian thực hiện kỹ thuật, nhân lực (chức danh chuyên môn nghề nghiệp, số lượng nhân lực), thuốc, thiết bị y tế... trong Hướng dẫn quy trình kỹ thuật do Bộ Y tế ban hành dựa trên tính phổ biến, thường quy thực hiện tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh. Trong thực tế triển khai, căn cứ diễn biến lâm sàng, tình trạng người bệnh, điều kiện thực tế của cơ sở khám bệnh, chữa bệnh, việc triển khai kỹ thuật có thể cần huy động thêm nhân lực chuyên môn, bổ sung thuốc, thiết bị y tế..., tăng thời gian thực hiện kỹ thuật...
4. Chỉ sử dụng các thuốc, thiết bị y tế... được cấp phép lưu hành theo quy định hiện hành.
5. Trong quá trình triển khai áp dụng Hướng dẫn quy trình kỹ thuật, nếu thấy các bất cập hoặc nhu cầu cần sửa đổi, bổ sung, các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh chủ động cập nhật và ban hành Hướng dẫn quy trình kỹ thuật, đồng thời báo cáo, đề xuất Bộ Y tế (Cục QLKCB) về việc cập nhật để ban hành áp dụng trong cả nước.

MỤC LỤC

LỜI NÓI ĐẦU

NGUYÊN TẮC ÁP DỤNG HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT

PHỤ LỤC DANH MỤC KỸ THUẬT

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

1. Vi khuẩn kỵ khí kháng thuốc định lượng MIC	1
2. Vi khuẩn vi hiếu khí kháng thuốc định lượng MIC	6
3. Vi khuẩn vi hiếu khí kháng thuốc định tính.....	11
4. Vi khuẩn/vi nấm kháng thuốc định lượng vi pha loãng (MIC – nhiều loại kháng sinh)	16
5. Vi khuẩn kháng thuốc định lượng - Colistin vi pha loãng (MIC).....	21
6. Vi nấm định danh giải trình tự gen	25
7. Vi nấm kháng thuốc giải trình tự gen.....	32
8. Vi sinh vật nhiễm khuẩn sinh dục - tiết niệu Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	39
9. Xác định gen vi khuẩn kháng kháng sinh Real-time PCR đa môi.....	45
10. NTM (Nontuberculous mycobacteria) định danh Real-time PCR hệ thống tự động.....	51
11. Xét nghiệm phát hiện trứng giun sán bằng phương pháp lắng cặn phân..	59
12. <i>Helicobacter pylori</i> kháng thuốc định lượng	63
13. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Ab ngưng kết hạt.....	68
14. EHEC miễn dịch tự động	74
15. HBeAg định lượng	79
16. HIV Ab ngưng kết hạt.....	85
17. Xét nghiệm phân bằng phương pháp Katokatz.....	92
18. Xét nghiệm phát hiện trứng giun sán trong phân bằng phương pháp Kato.....	96
19. Xác định M2BPGi miễn dịch tự động.....	100
20. Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp đa tác nhân (cho ≥ 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm) test nhanh...	105
21. Virus/ vi khuẩn nhiễm khuẩn hô hấp khuếch đại.....	109
nucleic acid (NAAT) đẳng nhiệt	109
22. Ký sinh trùng, tế bào soi phân tự động	113
23. VDRL định tính, định lượng.....	117

24. Vi sinh vật nhiễm khuẩn huyết digital PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	121
25. Vi khuẩn miễn dịch huỳnh quang	130
26. Virus miễn dịch huỳnh quang	135
27. Vi nấm miễn dịch huỳnh quang	140
28. Dengue-Chikungunia-Zika virus Real-time PCR	145
29. Beta - D glucan định lượng	150

PHỤ LỤC

DANH MỤC KỸ THUẬT

STT trong QTKT	STT kỹ thuật trong Chương	Mã liên kết	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT
(Cột 1)	(Cột 2)	(Cột 3)	(Cột 4)
1	53		Vi khuẩn kỵ khí kháng thuốc định lượng (MIC)
2	54		Vi khuẩn vi hiếu khí kháng thuốc định lượng (MIC)
3	55		Vi khuẩn vi hiếu khí kháng thuốc định tính
4	56		Vi khuẩn/vi nấm kháng thuốc định lượng vi pha loãng (MIC - nhiều loại kháng sinh)
5	57		Vi khuẩn kháng thuốc định lượng - Colistin vi pha loãng (MIC)
6	87		Vi nấm định danh giải trình tự gene
7	88		Vi nấm kháng thuốc giải trình tự gene
8	99		Vi sinh vật nhiễm khuẩn sinh dục - tiết niệu Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)
9	100		Xác định gen vi khuẩn kháng kháng sinh Real-time PCR đa môi
10	126		NTM (Nontuberculous mycobacteria) định danh Real-time PCR hệ thống tự động
11	136		Xét nghiệm phát hiện trứng giun sán bằng phương pháp lắng cận phân
12	198		Helicobacter pylori kháng thuốc định lượng
13	215		Mycoplasma pneumoniae Ab ngưng kết hạt
14	249		EHEC miễn dịch tự động

STT trong QTKT	STT kỹ thuật trong Chương	Mã liên kết	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT
15	304		HBeAg định lượng
16	341		HIV Ab ngưng kết hạt
17	439		Xét nghiệm phân bằng phương pháp Katokatz
18	440		Xét nghiệm phát hiện trứng giun sán trong phân bằng phương pháp Kato
19	506		Xác định M2BPGi miễn dịch tự động
20	512		Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp đa tác nhân (cho ≥ 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm) test nhanh
21	522		Virus/vi khuẩn nhiễm khuẩn hô hấp khuếch đại nucleic acid (NAAT) đẳng nhiệt
22	527		Ký sinh trùng, tế bào soi phân tự động
23	528		VDRL định tính và định lượng
24	530		Vi sinh vật nhiễm khuẩn huyết digital PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)
25	532		Vi khuẩn miễn dịch huỳnh quang
26	533		Virus miễn dịch huỳnh quang
27	534		Vi nấm miễn dịch huỳnh quang
28	536		Dengue-Chikungunia-Zika virus Real-time PCR
29	543		Beta - D - glucan định lượng

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ATSH		An toàn sinh học
Ab	Antibody	Kháng thể
Ag	Antigen	Kháng nguyên
BCĐN		Bạch cầu đa nhân
BTS	Baterial test standard	
CDAB	Clostridium difficile toxin A và toxin B	
CMIA	Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay	thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang
CLIA	Chemiluminescence immunoassay	Thử nghiệm miễn dịch hóa phát quang
CLSI	Clinical and laboratory standards institute	Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm
CO	Cut off	Ngưỡng
Ct	Cycle threshold	Chu kỳ ngưỡng
DNA	Deoxyribonucleic acid	
ECLIA	Electrochemiluminescent ImmunoAssay	Thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang
ELFA	Enzyme immunoassay sandwich method with a final fluorescent detection	Xét nghiệm huỳnh quang liên kết gắn enzyme
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay	Miễn dịch hấp phụ gắn enzym
EQA	External Quality Assessment	Ngoại kiểm
EQC	External Quality Control	Kiểm soát chất lượng bằng vật liệu bên ngoài
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	Ủy ban Châu Âu về thử nghiệm nhạy cảm kháng sinh
GDH	Glutamate dehydrogenase	Kháng nguyên GDH
HBV	Hepatitis B virus	Virus viêm gan B
HCV	Hepatitis C virus	Virus viêm gan C
HCCA	α -Cyano-4 hydroxycinnamic acid	
HIV	Human Immunodeficiency Virus – Virus	Virus gây suy giảm miễn dịch ở người

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
HPC	High positive control	Chứng dương cao
HT		Huyết thanh
I	Intermediate	Trung gian
IQC	Internal Quality Control	Kiểm soát chất lượng nội bộ
IU	International unit	Đơn vị Quốc tế
KKT		Kháng kháng thể
KN-KT		Kháng nguyên - Kháng thể
KSD		Kháng sinh đồ
KST		Ký sinh trùng
LPC	Low positive control	Chứng dương thấp
MALDI-Tof	Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight	
MEC	Minimal effective concentration	Nồng độ hiệu quả tối thiểu
MIC	Minimal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MSDS	Material Safety Data Sheet	Bảng dữ liệu an toàn hóa chất
NC	Negative control	Chứng âm
non-WT	non wild type	Biến chủng
OD	Optical density	Mật độ quang
PC	Positive control	Chứng dương
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi
QC	Quality control	Kiểm soát chất lượng
R	Resistant	Đề kháng
RFV	Relative Fluorescence Value	Giá trị huỳnh quang tương đối
RNA	Ribonucleic acid	
RT – PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi phiên mã ngược
S	Susceptible	Nhạy cảm
VD		Ví dụ
VK		Vi khuẩn
VSV		Vi sinh vật
WT	Wild type	Chủng hoang dại

1. Vi khuẩn kị khí kháng thuốc định lượng MIC (cho 1 loại kháng sinh)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm và nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh với chủng vi khuẩn gây bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dải giấy kháng sinh có kích thước 5 x 57 mm được thấm kháng sinh theo bậc nồng độ ($\mu\text{g/mL}$). Có 15 nồng độ kháng sinh được pha loãng bậc 2 gắn cố định ở một mặt của dải giấy. Khi dải giấy kháng sinh được đặt lên mặt thạch đã dàn vi khuẩn, kháng sinh nhanh chóng khuếch tán trong thạch. Sau khi nuôi cấy qua đêm, sẽ xuất hiện vùng ức chế hình elip đối xứng qua dải giấy. Giá trị MIC được xác định tại điểm cắt của hình elip với dải giấy kháng sinh. Giá trị MIC sẽ được phiên giải ra phân loại **S** (susceptibility – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng) theo hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Thiết bị y tế

- Dải giấy kháng sinh.
- Canh thang phù hợp cho vi khuẩn kị khí.
- Thạch nuôi cấy vi khuẩn kị khí.
- Thạch kháng sinh đồ cho vi khuẩn kị khí.
- Túi tạo khí trường kị khí.
- Ống canh thang BHI 15% glycerol.
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh.
- Cồn 70%.
- Dung dịch nước rửa tay.
- Dung dịch khử trùng.
- Đầu côn 1000 μL tiệt trùng.
- Đầu côn 200 μL tiệt trùng.
- Bút viết không xóa.
- Que cấy.
- Ống nghiệm thủy tinh.

- Tăm bông vô trùng.
- khay đựng bệnh phẩm.
- Hộp nuôi cấy kỵ khí.
- Panh.
- Bộ độ đục chuẩn McFarland.
- Micropipette.
- Chủng vi khuẩn chuẩn.
- Giấy thấm.
- Mũ giấy.
- Khẩu trang.
- Găng khám.
- Găng tay xử lý dụng cụ.
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý.
- Áo choàng phòng xét nghiệm.
- Khăn lau tay.
- Túi rác các loại.
- Tủ âm.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2.
- Lò hấp tiệt trùng.
- Tủ sấy.
- Máy đo pH.
- Máy đo độ đục.
- Máy vortex.
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm.
- Bộ lưu điện.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C.
- Tủ lạnh âm sâu -20°C.
- Tủ lạnh âm sâu -70°C.
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl.
- Bàn xét nghiệm.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh trên môi trường không có chất chọn lọc.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: Khoảng 48 giờ (2 ngày).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

- *Pha huyền dịch vi khuẩn*

Dùng que cấy lấy vi khuẩn 5 (có thể nhiều hơn 5) khuẩn lạc có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống canh thang Brucella (hoặc canh thang khác), lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất và có độ đục bằng với độ đục của ống McFarland 0,5. (Không để đĩa cấy vi khuẩn ra ngoài môi trường quá 30 phút cho đến lúc lấy khuẩn lạc).

- *Dàn đều canh khuẩn lên mặt đĩa thạch*

Dùng tăm bông vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn tăm bông trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt phần huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông. Sau đó, ria đều que tăm bông trên toàn bộ mặt đĩa thạch Fastidious anaerobe agar sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt đĩa thạch.

- *Đặt các khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch*

Đặt dải giấy kháng sinh lên mặt thạch sao cho mặt có ghi dải nồng độ hướng lên trên và phải đảm bảo toàn bộ bề mặt của dải giấy kháng sinh được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Khi đã đặt xong dải giấy kháng sinh không được dịch chuyển dải giấy kháng sinh khỏi vị trí.

- *Ủ ấm*

Đĩa thạch trong hộp kín có chứa túi tạo môi trường kỵ khí rồi đặt hộp vào tủ ấm 35-37°C trong 24 - 48 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Sau ủ ấm 24 – 48h và khi thấy rõ vi khuẩn mọc, đọc giá trị MIC ở điểm cắt của hình elip với dải giấy kháng sinh. Làm tròn giá trị MIC ở điểm giữa hai bậc pha loãng lên giá trị cao hơn một bậc trước khi phiên giải kết quả.
- Phiên giải kết quả MIC ra giá trị S, I hoặc R theo tài liệu hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lẫn hai hay nhiều chủng vi khuẩn.
- Vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.
- Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Kết quả QC hàng tuần, mỗi khi nhận lô kháng sinh mới, lô môi trường mới, mỗi lần nhận sinh phẩm, hóa chất phải đạt yêu cầu theo hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST phiên bản cập nhật hàng năm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù hàng năm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

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

2. Vi khuẩn vi hiếu khí kháng thuốc định lượng MIC (cho 1 loại kháng sinh)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm và nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh với chủng vi khuẩn gây bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dải giấy kháng sinh có kích thước 5 x 57 mm được thấm kháng sinh theo bậc nồng độ ($\mu\text{g/mL}$). Có 15 nồng độ kháng sinh được pha loãng bậc 2 gắn cố định ở một mặt của dải giấy. Khi dải giấy kháng sinh được đặt lên mặt thạch đã dàn vi khuẩn, kháng sinh nhanh chóng khuếch tán trong thạch. Sau khi nuôi cấy qua đêm, sẽ xuất hiện vùng ức chế hình elip đối xứng qua dải giấy. Giá trị MIC được xác định tại điểm cắt của hình elip với dải giấy kháng sinh. Giá trị MIC sẽ được phiên giải ra phân loại **S** (susceptibility – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng) theo hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Thiết bị y tế

- Dải giấy kháng sinh
- Canh thang Brucella
- Thạch máu có chất dinh dưỡng bổ sung
- Thạch Muller-Hinton F (MHF)
- Túi tạo khí trường vi hiếu khí
- Túi tạo khí trường kỵ khí (nếu thử nghiệm metronidazol)
- Ống canh thang BHI 15% glycerol
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μL tiết trùng
- Đầu côn 200 μL tiết trùng
- Bút viết không xóa

- Que cấy
- Ống nghiệm thủy tinh
- Tăm bông vô trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp nuôi cấy kỵ khí
- Panh
- Bộ độ đục chuẩn McFarland
- Micropipette
- Chủng vi khuẩn chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ ẩm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chúng vi khuẩn cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh trên môi trường không có chất chọn lọc.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: Khoảng 72 giờ (3 ngày).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

- *Pha huyền dịch vi khuẩn*

Dùng que cấy lấy vi khuẩn 5 (có thể nhiều hơn 5) khuẩn lạc có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống canh thang Brucella (hoặc canh thang khác), lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất và có độ đục bằng với độ đục của ống McFarland 0,5 hay lớn hơn tùy theo yêu cầu của từng loài vi khuẩn. (Không để đĩa cấy vi khuẩn ra ngoài môi trường quá 30 phút cho đến lúc lấy khuẩn lạc).

- *Dàn đều canh khuẩn lên mặt đĩa thạch*

Dùng tăm bông vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn tăm bông trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt phần huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông. Sau đó, ria đều que tăm bông trên toàn bộ mặt đĩa thạch MHF sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt đĩa thạch.

- *Đặt các khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch*

Đặt dải giấy kháng sinh lên mặt thạch sao cho mặt có ghi dải nồng độ hướng lên trên và phải đảm bảo toàn bộ bề mặt của dải giấy kháng sinh được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Khi đã đặt xong dải giấy kháng sinh không được dịch chuyển dải giấy kháng sinh khỏi vị trí.

- *Ủ ấm*

Đĩa thạch trong hộp kín có chứa túi tạo môi trường vi hiếu khí (hoặc môi trường kỵ khí nếu thử nghiệm metronidazole 1 ngày sau đó chuyển sang môi trường vi hiếu khí) rồi đặt hộp vào tủ ấm 35-37°C trong 48 -72 giờ tùy từng loài vi khuẩn.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Chỉ đọc kết quả kháng sinh đồ chủng bệnh nhân khi kết quả QC đạt.

4.2.2. Đọc kết quả:

- 48 - 72 giờ tùy từng loài vi khuẩn và khi thấy rõ vi khuẩn mọc, đọc giá trị MIC ở điểm cắt của hình elip với dải giấy kháng sinh. Làm tròn giá trị MIC ở điểm giữa hai bậc pha loãng lên giá trị cao hơn một bậc trước khi phiên giải kết quả.
- Phiên giải kết quả MIC ra giá trị S, I hoặc R theo tài liệu hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lấn hai hay nhiều chủng vi khuẩn.
- Vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.
- Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Kết quả QC hàng tuần, mỗi khi nhận lô kháng sinh mới, lô môi trường mới, mỗi lần nhận sinh phẩm, hóa chất phải đạt yêu cầu theo hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST phiên bản cập nhật hàng năm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù hàng năm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

3. Vi khuẩn vi hiếu khí kháng thuốc định tính

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm của kháng sinh với chủng vi khuẩn gây bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn thử nghiệm được đánh giá dựa vào vùng ức chế tạo ra xung quanh khoanh giấy thấm kháng sinh. Khi đặt khoanh giấy kháng sinh trên bề mặt thạch, kháng sinh sẽ khuếch tán vào trong thạch; càng xa khoanh giấy, nồng độ kháng sinh càng giảm. Sự phát triển của vi khuẩn sẽ bị ức chế khi kháng sinh đạt đến một nồng độ nhất định. Đường kính vùng ức chế tỷ lệ thuận với mức độ nhạy cảm được phiên giải ra các phân loại **S** (susceptibility – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng) khi so sánh với bảng chuẩn CSLI cập nhật.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Thiết bị y tế

- Khoanh giấy kháng sinh
- Môi trường thử nghiệm kháng sinh cho vi khuẩn vi hiếu khí
- Môi trường lưu giữ chủng
- Nước muối sinh lý
- Túi tạo môi trường vi hiếu khí
- Thạch cấy chủng
- Cồn 70%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Ống canh thang BHI 15% glycerol
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiết trùng
- Đầu côn 200 μ L tiết trùng
- Bút viết không xóa
- Que cấy
- Tăm bông vô trùng

- Ống nghiệm thủy tinh
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp nuôi cấy vi hiếu khí
- Panh
- Bộ độ đục chuẩn McFarland
- Micropipette
- Chủng vi khuẩn chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ ẩm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh trên môi trường không có chất chọn lọc.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, mã bệnh phẩm, loài vi khuẩn yêu cầu làm kháng sinh đồ.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 24 - 48 giờ.

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

- *Pha huyền dịch vi khuẩn*

Dùng que cấy chấm vài đầu khuẩn lạc có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống canh thang Muller-Hinton (hoặc nước muối sinh lý), lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất và có độ đục bằng với độ đục của ống McFarland 0,5 hay lớn hơn tùy theo yêu cầu của từng loài vi khuẩn. (Không để đĩa cấy vi khuẩn ra ngoài môi trường quá 30 phút cho đến lúc lấy khuẩn lạc).

- *Dàn đều canh khuẩn lên mặt đĩa thạch*

Dùng tăm bông vô trùng nhúng vào ống huyền dịch vi khuẩn đã pha ở trên, ép nhẹ và xoay tròn tăm bông trên thành bên của ống huyền dịch vi khuẩn để loại bớt phần huyền dịch vi khuẩn đã thấm vào đầu tăm bông. Sau đó, ria đều que tăm bông trên toàn bộ mặt đĩa thạch MHF sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt đĩa thạch.

- *Đặt các khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch*

Đặt khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch và ấn xuống để phải đảm bảo toàn bộ bề mặt của khoanh giấy kháng sinh được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Khi đã đặt xong khoanh giấy kháng sinh không được dịch khỏi vị trí đã đặt.

- *Ủ ấm*

Đĩa thạch trong hộp kín có chứa túi tạo môi trường vi hiếu khí (hoặc môi trường kỵ khí nếu thử nghiệm metronidazole 1 ngày sau đó chuyển sang môi trường vi hiếu khí) rồi đặt hộp vào tủ ấm ở nhiệt độ tối ưu cho vi khuẩn thử nghiệm trong 24 - 48 giờ tùy từng loài vi khuẩn.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Chỉ đọc kết quả kháng sinh đồ chủng bệnh nhân khi kết quả QC đạt.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Sau thời gian ủ ấm phù hợp, khi thấy rõ vi khuẩn mọc, Đo đường kính vùng ức chế (bao gồm cả đường kính của khoanh giấy kháng sinh) tính theo mm. Phiên giải đường kính vùng ức chế ra kết quả S, I, R theo hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lấn hai hay nhiều chủng vi khuẩn.
- Vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.
- Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Kết quả QC hàng tuần, mỗi khi nhận lô kháng sinh mới, lô môi trường mới, mỗi lần nhận sinh phẩm, hóa chất phải đạt yêu cầu theo hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST phiên bản cập nhật hàng năm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù hàng năm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

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

4. Vi khuẩn/vi nấm kháng thuốc định lượng vi pha loãng (MIC – nhiều loại kháng sinh)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm và nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh với chủng vi khuẩn/vi nấm gây bệnh bằng kỹ thuật vi pha loãng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kháng sinh đông khô có nồng độ cố định, giảm dần theo bậc hai được chuẩn bị sẵn trong các giếng. Huyền dịch chủng vi khuẩn/vi nấm trong canh thang sẽ được nuôi cấy trong các giếng này. Nồng độ ức chế tối thiểu là nồng độ kháng sinh thấp nhất có tác dụng ức chế hoàn toàn vi khuẩn/vi nấm được đưa vào các giếng. Giá trị MIC/MEC sẽ được phiên giải ra phân loại **S** (susceptibility – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng), **WT** (wild type) hoặc **non-WT** (non wild type) theo hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Thiết bị y tế

- Khay kháng sinh/kháng nấm đông khô
- Nước pha canh khuẩn
- Canh thang kháng sinh đồ/kháng nấm đồ
- Thạch dinh dưỡng
- Ống canh thang BHI 15% glycerol
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 100 µL tiệt trùng
- Đầu côn 200 µL tiệt trùng
- Bút viết không xóa
- Que cấy
- Ống nghiệm thủy tinh
- Tăm bông vô trùng

- khay đựng bệnh phẩm
- Bộ độ đục chuẩn McFarland
- Micropipette đa kênh
- Chủng chủng vi khuẩn chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ ấm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chủng vi khuẩn/vi nấm được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần được nuôi cấy trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh trên môi trường không có chất chọn lọc.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, mã bệnh phẩm, loài vi khuẩn yêu cầu làm kháng sinh đồ.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 48 – 72 giờ (2 – 3 ngày) tùy theo loài vi khuẩn/vi nấm.

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- *Pha huyền dịch vi khuẩn*

Dùng que cấy lấy khuẩn lạc vi khuẩn nghiền đều vào ống nước pha canh khuẩn, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất. Điều chỉnh để có độ đục tương ứng với McFarland 0,5.

- *Phân bố canh khuẩn vào các giếng*

Chuyển một lượng huyền dịch sang ống canh thang để có nồng độ vi khuẩn/vi nấm cần đạt được theo yêu cầu của nhà sản xuất. Dùng pipette đa kênh chuyển vào mỗi giếng của plate 100 µl canh khuẩn đã pha. Dán toàn bộ bề mặt plate bằng tấm băng dính. Huyền dịch vi khuẩn/vi nấm sau khi pha phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút.

- *Ủ ấm*

Ủ khay trong tủ ấm trong khoảng thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tùy loài vi khuẩn/vi nấm.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

Chỉ đọc kết quả kháng sinh đồ chủng bệnh nhân khi kết quả QC đạt.

4.2.2. Đọc kết quả

Kiểm tra giếng chứng vi khuẩn phải có sự phát triển của vi khuẩn.

- Giá trị MIC/MEC được xác định tại giếng có nồng độ kháng sinh nhỏ nhất mà ức chế được vi khuẩn trong giếng.

- Phiên giải kết quả MIC ra giá trị S, I hoặc R; WT hoặc non WT theo tài liệu của CLSI hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lấn hai hay nhiều chủng vi khuẩn.
 - Giếng chứa vi khuẩn không mọc tốt
 - Hiện tượng skip nhiều giếng
- Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Kết quả QC hàng tuần, mỗi khi nhận lô kháng sinh mới, lô môi trường mới, mỗi lần nhận sinh phẩm, hóa chất phải đạt yêu cầu theo hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST phiên bản cập nhật hàng năm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù hàng năm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

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

5. Vi khuẩn kháng thuốc định lượng - Colistin vi pha loãng (MIC)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm và nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh colistin với chủng vi khuẩn Gram âm gây bệnh bằng Kỹ thuật vi pha loãng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kháng sinh colistin đông khô có nồng độ cố định, giảm dần theo bậc hai được chuẩn bị sẵn trong các giếng. Huyền dịch chủng vi khuẩn trong canh thang sẽ được nuôi cấy trong các giếng này. Nồng độ ức chế tối thiểu là nồng độ kháng sinh thấp nhất có tác dụng ức chế hoàn toàn vi khuẩn được đưa vào các giếng. Giá trị MIC sẽ được phiên giải ra phân loại **S** (susceptibility – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng) theo hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Thiết bị y tế

- Khay kháng sinh/kháng nấm đông khô
- Nước pha canh khuẩn
- Canh thang MH
- Thạch dinh dưỡng
- Ống canh thang BHI 15% glycerol
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 100 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 200 μ L tiệt trùng
- Bút viết không xóa
- Que cấy
- Ống nghiệm thủy tinh
- Tăm bông vô trùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Bộ đọc đục chuẩn McFarland

- Micropipette đa kênh
- Chủng chủng vi khuẩn chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ ẩm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chủng vi khuẩn Gram âm được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần được nuôi cấy trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh trên môi trường không có chất chọn lọc.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, mã bệnh phẩm, loài vi khuẩn yêu cầu làm kháng sinh đồ.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 24 giờ.

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

- *Pha huyền dịch vi khuẩn*

Dùng que cấy lấy khuẩn lạc vi khuẩn nghiền đều vào ống nước pha canh khuẩn, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất. Điều chỉnh để có độ đục tương ứng với McFarland 0,5.

- *Phân bố canh khuẩn vào các giếng*

Chuyển 50 uL huyền dịch sang ống canh thang 11.5 mL để có nồng độ vi khuẩn cần đạt được theo yêu cầu của nhà sản xuất. Dùng pipette đa kênh chuyển vào mỗi giếng của plate 100 μ L canh khuẩn đã pha. Dán toàn bộ bề mặt plate bằng tấm băng dính. Huyền dịch vi khuẩn/ sau khi pha phải được sử dụng ngay trong vòng 15 phút.

- *Ủ ấm*

Ủ khay trong tủ ấm 18 - 24 giờ.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC)

Chỉ đọc kết quả kháng sinh đồ chủng bệnh nhân khi kết quả QC đạt.

4.2.2. Đọc kết quả

Kiểm tra giếng chứng vi khuẩn phải có sự phát triển của vi khuẩn.

- Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ kháng sinh nhỏ nhất mà ức chế được vi khuẩn trong giếng.
- Phiên giải kết quả MIC ra giá trị S, I hoặc R theo tài liệu của CLSI hoặc EUCAST cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lấn hai hay nhiều chủng vi khuẩn.
- Giếng chứng vi khuẩn không mọc tốt
- Hiện tượng skip nhiều giếng

Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Kết quả QC hàng tuần, mỗi khi nhận lô kháng sinh mới, lô môi trường mới, mỗi lần nhận sinh phẩm, hóa chất phải đạt yêu cầu theo hướng dẫn của CLSI hoặc EUCAST phiên bản cập nhật hàng năm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù hàng năm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

6. Vi nấm định danh giải trình tự gen

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định căn nguyên vi nấm có mặt trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Đoạn ADN đặc trưng của vi nấm được nhân dòng bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xác định bằng kỹ thuật sequencing, sau đó so sánh trình tự nucleotide này trong ngân hàng dữ liệu GeneBank để xác định chủng vi nấm tương đồng.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý (4 bộ/ người/năm)
- Áo choàng phòng xét nghiệm (1 cái/ người/năm)
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 μ l – 1000 μ l
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi nấm đã được nuôi cấy thuần
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 5 ngày.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

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

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu vi nấm chuẩn hoặc mẫu vi nấm đã được định danh, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 oC trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Môi xuôi	1.0
4	Môi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết DNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	56 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	10 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2%
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μl sản phẩm PCR + 1.5 μl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme

e. Thực hiện phản ứng PCR sequencing

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	4 phút	

f. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

g. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20μL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự.
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự của mẫu thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.
- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database có sẵn trong ngân hàng dữ liệu.

- Các trình tự có mức độ tương đồng $\geq 99\%$ thì được coi là chủng vi nấm tương đồng cao

Chú ý:

- Trong trường hợp trình tự tương đồng $< 99\%$, thì kiểm tra tỷ lệ các chủng vi nấm, nếu chủng nào chiếm tỷ lệ cao ($>2/3$) thì có thể kết luận mẫu tương đồng với chủng đó.
- Kết quả Blast Search có tỷ lệ tương đồng thấp ($< 90\%$) và không có chủng nào chiếm tỷ lệ quá $2/3$ thì kết quả đó “Không có giá trị” và cần lặp lại xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẽ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.
- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

7. Vi nấm kháng thuốc giải trình tự gen

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định đột biến ở các gen liên quan đến kháng thuốc của vi nấm bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide (sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý

Đoạn ADN của các gen liên quan đến kháng thuốc của vi nấm được nhân dòng bằng kỹ thuật PCR, trình tự nucleotide được xác định bằng kỹ thuật sequencing. Trình tự này sau đó được phân tích và so sánh với các chủng vi nấm dạng hoang dã (Wild type) để xác định các đột biến có liên quan đến kháng thuốc của vi nấm.

Định nghĩa

- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh
- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản ADN
- Sequencing: Là một kỹ thuật trong phòng thí nghiệm, được sử dụng để xác định trình tự của các loại bazơ (A, C, T và G) trong phân tử ADN
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm spindown
- Máy Vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy tách chiết ADN
- Máy PCR
- Máy điện di sản phẩm PCR
- Máy giải trình tự nucleotide
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C

- Tủ lạnh âm sâu -80°C
- Pipette các loại từ 2.5 µl – 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: chủng vi nấm đã được nuôi cấy thuần.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 5 ngày.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy định của chuyên ngành vi sinh

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

a. Tách chiết ADN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu vi nấm chuẩn hoặc mẫu vi nấm có chứa đột biến gen kháng thuốc đã được định danh, tiến hành tách chiết chứng dương đồng thời với các bệnh phẩm khác.
- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công

b. Thực hiện phản ứng PCR

- Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng PCR
- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống} = \text{Số bệnh phẩm} + 3$$

Chú ý: Một lần thực hiện PCR cần tiến hành đồng thời 3 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo quá trình thực hiện PCR; Chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết ADN không bị nhiễm; Chứng NTC (None Template Control) để đảm bảo Master mix của phản ứng PCR không bị nhiễm.

- Tiến hành tan đá các ống trong kit Taq PCR Master Mix và các ống primer, sau đó giữ ở nhiệt độ 4 °C trên khay đá.
- Lấy 1 ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, không chứa DNase và để trên khay đá, sau đó trộn các thành phần Master mix theo công thức sau:

TT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	25.0
2	MgCl ₂	1.0
3	Mồi xuôi	1.0
4	Mồi ngược	1.0
5	H ₂ O	17.0
6	ADN khuôn	5.0
7	Tổng thể tích	50

- Chia mỗi ống phản ứng PCR 50 μl của hỗn hợp trên.

Quy trình PCR

- Chuyển 5 μl sản phẩm tách chiết DNA cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chu trình nhiệt sau:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95 °C	5 phút	1 chu kỳ
2	95 °C	20 giây	35 chu kỳ
	58 °C	30 giây	
	72 °C	1 phút	
3	72 °C	15 phút	1 chu kỳ
4	4 °C	Bảo quản	

c. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

- Chuẩn bị Agarose 1,2 %
- Đun nóng chảy agarose bằng lò vi sóng (2-3 phút), để nguội đến 55-60 °C và đổ vào khuôn đã cài sẵn lược.
- Để gel đông sau khoảng 20 phút, đặt bản gel vào bể điện di đã bổ sung buffer TAE 1x và sau đó tiến hành điện di.
- Thành phần 1 giếng điện di như sau: 5 μl sản phẩm PCR + 1.5 μl Loading Dye. Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng trên bản gel
- Điện di với cường độ dòng điện 100 V trong 30 phút
- Đọc và phân tích kết quả điện di trên máy chụp gel

d. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Tinh sạch bằng phương pháp cột lọc hoặc bằng phương pháp enzyme
- Thực hiện phản ứng PCR sequencing*

- Thành phần phản ứng PCR sequencing:

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Master mix	2.0
2	Đệm (Buffer)	4.0
3	Mồi (Primer)	1.0
4	ADN khuôn	1.0
5	H ₂ O	12.0
6	Tổng thể tích	20.0

- Chu trình nhiệt phản ứng PCR sequencing:

TT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	96 °C	1 phút	1 chu kỳ
2	96 °C	10 giây	25 chu kỳ
	50 °C	5 giây	
	60 °C	4 phút	

e. Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing

- Tinh sạch bằng phương pháp hạt bead hoặc phương pháp cột lọc

f. Thực hiện đọc trình tự nucleotide

- Hút 20μL sản phẩm PCR sequencing đã tinh sạch vào plate.
- Đặt plate vào vị trí đọc trên máy giải trình tự.
- Thực hiện giải trình tự nucleotide trên máy sequencing theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu dữ liệu chứa trình tự nucleotide của mẫu xét nghiệm vào máy tính. Chọn ổ đĩa cứng hoặc di động để tránh làm mất hoặc hỏng dữ liệu.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả các chứng

- Chỉ phân tích kết quả của mẫu xét nghiệm khi các chứng NC, NTC, PC đạt yêu cầu

4.2.2. Đọc kết quả

- Trình tự của mẫu thu nhận được từ máy sequencing được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để loại bỏ các sai số.

- Đưa trình tự nucleotide lên ngân hàng dữ liệu gen (<http://ncbi.nlm.gov/blast>).
- Bấm Search để tiến hành so sánh với các database trong ngân hàng dữ liệu về kháng thuốc của vi nấm.
- Kết quả so sánh hiển thị không có hoặc có các điểm đột biến liên quan đến kháng và mức độ đề kháng các loại thuốc đang sử dụng trong điều trị nấm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Xem xét và đánh giá lại toàn bộ các bước trước, trong và sau xét nghiệm để loại bỏ các yếu tố sai sót trước khi trả kết quả xét nghiệm. Trong trường hợp phát hiện ra sai sót cần hủy kết quả xét nghiệm.
- Trả kết quả xét nghiệm theo quy định bằng bản cứng hoặc bản điện tử.
- Lưu hồ sơ kết quả xét nghiệm bằng bản cứng và bản điện tử.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh: nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách. Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.
- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Không tách chiết được ADN: kiểm tra thông qua hiệu quả tách của mẫu chứng dương (PC). Nếu PC âm tính cần kiểm tra lại thuốc thử của bộ kit và phương pháp tách chiết theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Mẻ PCR bị nhiễm: kiểm tra thông qua chứng âm (NC) và chứng NTC. Trong trường hợp chứng NC dương tính và NTC âm tính thì khâu tách chiết bị nhiễm, xem xét lại quá trình tách chiết. Trong trường hợp chứng NC âm tính và NTC dương tính thì khâu pha mix bị nhiễm, xem xét lại khâu pha mix. Nếu cả NC và NTC dương tính thì cần xem xét lại cả quá trình tách chiết, pha mix và PCR.
- Kết quả sequencing không tốt: kiểm tra thông qua các tín hiệu nucleotide (ATGC). Nếu tín hiệu các nucleotide không rõ ràng cần kiểm tra lại thiết bị giải trình tự theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc và phiên giải kết quả tương đồng giữa trình tự nucleotide phải chính xác, có sự kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn. Cần đảm bảo đọc kết quả theo đúng quy định đã đề cập trong mục 4.2.2.
- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia.

- Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Cần thực hiện kiểm tra chất lượng xét nghiệm theo quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng để đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm
- Các xét nghiệm có kết quả bất thường hoặc nghi ngờ cần phải thực hiện lại hoặc gửi đến các phòng xét nghiệm tham chiếu/cơ sở y tế đã được chứng nhận về chất lượng để khẳng định lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

8. Vi sinh vật nhiễm khuẩn sinh dục - tiết niệu Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện DNA đặc trưng của các vi sinh vật *C.trachomatis* (CT), *N.gonorrhoea* (NG), *M.genitalium* (MG), *M.hominis* (MH), *U.urealyticum* (UU), *U.parvum* (UP) và *T.vaginalis* (TV) trong mẫu bệnh phẩm của người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm dựa trên công nghệ MuDT™ (Công nghệ phát hiện đa đích) và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml

- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm:
 - + Nước tiểu: Bệnh nhân nhịn tiểu ít nhất 2 giờ trước khi lấy bệnh phẩm. Lấy 10 – 30 ml nước tiểu đầu đựng vào lọ vô trùng.
 - + Tăm bông dịch sinh dục: Sử dụng tăm bông đựng trong 1-3 ml môi trường vận chuyển.
 - + Dịch tế bào: Sử dụng môi trường bảo quản .
 - + Bệnh phẩm cần chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 24 giờ.
 - + Bảo quản bệnh phẩm: 2 – 8°C/1 tuần; 2 – 8°C/6 tuần khi bảo quản trong môi trường ThinxPrep, 2 – 8°C/2 tuần khi bảo quản trong môi trường Sure Path.

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

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Xử lý bệnh phẩm: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất và quy trình của phòng xét nghiệm.

- Nước tiêu: Để bệnh phẩm cân bằng ở nhiệt độ phòng. Lấy 1 ml nước tiêu ly tâm 15000 x g (13000 rpm) trong 15 phút. Loại bỏ nước nổi, thu cặn và hòa tan trong nước muối bằng cách lắc trộn trên máy vortex.
- Dịch ống cổ tử cung: Để bệnh phẩm cân bằng ở nhiệt độ phòng. Lấy 1 ml dịch tế bào ly tâm 15000 x g (13000 rpm) trong 15 phút. Loại bỏ nước nổi, thu cặn và hòa tan trong nước muối bằng cách lắc trộn trên máy vortex.

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

a. Tách chiết acid nucleic

- Sử dụng chứng nội sinh cho các loại bệnh phẩm, trừ nước tiêu.
- Trong bộ kit có chứng nội ASTI
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

** Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR*

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

l pư	N pư	Thành phần
5 µL	N * 5	4X STI-EA MOM
5 µL	N * 5	EM1
5 µL	N * 5	RNAse-free water
15 µL	N * 15	Tổng thể tích Mastermix

- Hút 15 µl Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR*: Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 5µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, chứng dương và chứng âm.
- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

Khi quá trình Real time-PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.
- Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2 Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Phòng xét nghiệm tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, phòng xét nghiệm tìm kiếm nguyên

nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

9. Xác định gen vi khuẩn kháng kháng sinh Real-time PCR đa môi

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Để phát hiện DNA của vi khuẩn kháng kháng sinh trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR đa môi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xác định vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm dựa trên công nghệ phát hiện đa đích và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml

- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm:
 - + Đờm: lấy ít nhất 1 ml đờm vào lọ vô trùng.
 - + Nước tiểu: Lấy nước tiểu đầu vào buổi sáng sau khi ngủ dậy, lấy khoảng 20 ml – 30 ml vào lọ vô trùng.
 - + Tăm bông
 - + Bệnh phẩm cạo từ đường hô hấp, đường tiêu hóa, sinh dục tiết niệu.
 - + Dịch hút, dịch tiết.
 - + Nuôi cấy vi khuẩn thu được bằng cách cấy mẫu bệnh phẩm lâm sàng trong môi trường canh thang hoặc môi trường thạch.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

a. Tách chiết acid nucleic

- Trước khi tách chiết cho 10 µl chứng nội (IC) vào từng giếng nhỏ bệnh phẩm. Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị sinh phẩm (Master mix) cho phản ứng Realtime PCR

- Số lượng ống PCR cần cho một lần xét nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Số lượng ống (N)} = \text{Số bệnh phẩm} + \text{số chứng} + 2$$

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

- Chuẩn bị ống Master Mix với tỷ lệ các thành phần như dưới đây:

Thành phần	Cho 1 phản ứng	Cho n phản ứng
PCR-Reaction Mix - 1 (20 µl/ống)	1 thanh 8 ống	1 x n
Taq Polymerase	10 µl	10 x n

- Đảo trộn ống nhẹ nhàng khoảng 5 lần hoặc vortex sau đó ly tâm spindown.
- Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

* *Real-time PCR:* Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Cho vào mỗi ống PCR 5 µl DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 5 µl chứng dương và 5 µl chứng âm. Thể tích cuối cùng là 25 µl.

- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt, màu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

- Khi quá trình Real time -PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích. Phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

- Đánh giá NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉ trả kết quả khi QC đạt.
- Đánh giá IC: Nếu kết quả không lên IC thì phải lặp lại xét nghiệm từ bước tách chiết.

4.2.2 Đọc kết quả: Theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

$\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

$\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

$\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

$\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

10. NTM (Nontuberculous mycobacteria) định danh Real-time PCR hệ thống tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định DNA đặc trưng của NTM (*Nontuberculous mycobacteria*) trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

Bộ sinh phẩm MTB/NTMe Real-time detection.

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng

Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0.1 ml)
- Tuýp 1.5 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.5 ml

- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động
- Hệ thống máy Real-time PCR tự động và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Đờm, các dịch sinh học (dịch phế quản, dịch não tủy, nước tiểu, phân...), dịch nuôi cấy, mảnh sinh thiết...
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

a) Đờm:

Xử lý đờm bằng dung dịch EZ:

Thêm thể tích tương đương của Dung dịch EZ (Cat.No. K-4418-4) vào mẫu đờm và lắc trộn mạnh bằng máy vortex trong 3 phút. Sau đó ủ mẫu trong 20 phút ở nhiệt độ phòng.

Lưu ý: Nếu mẫu quá nhớt, thêm gấp đôi thể tích Dung dịch EZ hoặc kéo dài thời gian ủ lên đến 30 phút.

b) Dịch phế quản (BAL):

- Trộn mẫu vừa đủ bằng máy vortex trong 1 phút. Chuyển 1 ml sang tube eppendorf 1,5 ml vô trùng

Lưu ý: Nếu mẫu nhớt, thêm NaOH 200 μ l 10 N và ủ ở nhiệt độ phòng (25 ° C) trong 15 phút.

- Ly tâm ở tốc độ 9.000 vòng / phút trong 5 phút và loại bỏ phần nước nổi phía trên.
- Thêm 1 ml 1x PBS hoặc nước muối thông thường, xoáy trong 30 giây, ly tâm mẫu ở tốc độ 9.000 vòng / phút trong 5 phút, và loại bỏ phần nổi phía trên. Lặp lại bước giặt này 3 lần.

Lưu ý: Nếu lớp trắng hình thành phía trên viên tế bào, hãy loại bỏ lớp có phần nổi phía trên và để lại viên tế bào

- Phần cặn còn lại được sử dụng để tách chiết DNA.

c) Nước tiểu:

- Chuyển 5 ~ 10 ml mẫu nước tiểu vào ống hình nón
- Ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng / phút trong 20 phút và loại bỏ phần nước nổi phía trên.
- Phần cặn còn lại được sử dụng để tách chiết DNA.

d) Mảnh sinh thiết

- Cắt hoặc nghiền mẫu mô trong bình vô trùng.

- Hòa tan trong 1 mL dung dịch PBS 1X.
- Ly tâm ở 15.000 x g (13.000 vòng / phút) trong 5 phút và loại bỏ phần nổi phía trên bằng pipette.

4.1.2. Tiến hành kỹ thuật

a. Tách chiết acid nucleic

- Thực hiện tách chiết bằng máy PCR tự động.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy

- Số lượng các ống đối chứng (PC, IPC) và axit nucleic đã tách (nếu để đông lạnh) nên được rã đông ở nhiệt độ phòng ít nhất 10 phút trước khi sử dụng. Ít nhất 4 ống premix (2 NTC, 2 PC) cần cho đối chứng thí nghiệm, vì thế số ống premix cần là:
- 4 (Đối chứng thí nghiệm) + số ống mẫu
- Vortex hơn 10 giây và ly tâm nhanh tất cả thuốc thử đối chứng và mẫu bệnh phẩm trước khi dùng.
- Mỗi phản ứng, trộn 44 μL of DEPC DW với 1 μL of IPC. Chuẩn bị nhiều hơn 1 ống so với số lượng cần để tránh trường hợp mất dung dịch do dính ống. Vortex và spin-down các ống 10 giây trước khi dùng. Bảng dưới đây là một ví dụ chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

Số mẫu (+extra)	1	8 (+2)	16 (+4)
IPC	1 μL	10 μL	20 μL
DEPC DW	44 μL	440 μL	880 μL
Tổng thể tích	45 μL	450 μL	900 μL
Thể tích/giếng	45 μL	Each 45 μL	Each 45 μL

- Nhỏ 45 μL hỗn hợp phản ứng đã pha trộn vào tất cả các ống premix.
- Nhỏ 5 μL DEPC DW vào các giếng NTC ở vị trí A1. Đậy các ống để tránh nhiễm chéo trong quá trình chuẩn bị
- Chuyển tất cả các ống đến một khu vực riêng trước khi chạy PCR để tránh nhiễm chéo. Nhỏ 5 μL PC vào các ống sẽ được đặt ở vị trí C1 và D1.
- Nhỏ 5 μL dịch chiết axit nucleic acid vào các giếng còn lại, ghi chú là mẫu nào tương ứng với mẫu bệnh phẩm gốc nào.
- Dùng kéo cắt Optical Film với kích thước phù hợp và dùng Optical Film Applicator để gắn chặt lên các ống nghiệm.

Chú ý: Để tránh lây chéo và cho kết quả sai lệch, hãy gắn thật cẩn thận.

- Để hòa tan các hạt premix, và khuấy trộn premix với mẫu DNA, hãy dùng *ExiSpin™* (Cat. no.: A-7040) và thực hiện 20 chu kỳ, tốc độ 2500 rpm, theo chu kỳ: spin-down 5 giây/lắc mạnh: 20 giây.

Chú ý: PCR premix có sẵn các thuốc thử PCR đông khô. Khuấy trộn premix không hiệu quả có thể cho kết quả PCR không chính xác, vì thế hãy khuấy trộn premix thật kỹ trước khi dùng.

- Khởi động máy PCR.
- Khi máy tách kết thúc, chuyển các ống phản ứng sang máy khuếch đại ngay.

Nhấn nút Standby Power Switch. Đèn LED sẽ đỏ

- Nhấn giữ nút Power 2 giây, sau khi máy tự kiểm tra, đèn LED sẽ lên màu xanh sau một tiếng “bíp” ngắn.
- Nhấn giữ nút Door 2 giây, cửa mở, đưa các ống phản ứng vào các vị trí định sẵn: NTC ở vị trí A1, B1; các ống PC ở vị trí C1, D1. Sau đó nhấn nút Door 2 giây để đóng cửa.

Chú ý: Nếu chạy ít hơn 6 hàng PCR, đưa các ống trống vào vị trí đối diện ở hàng thứ 12 để cân bằng áp lực của nắp nhiệt.

Dùng chương trình tạo định dạng file ‘*.xls’ để tạo bản đồ chạy mẫu

- Lưu file ở định dạng ‘*.xls’ ở vị trí dễ tìm.
- Nhấn chuột đúp vào biểu tượng ‘Run’ để khởi động chương trình, nếu như có thông báo ‘Máy chưa sẵn sàng-Device is Not ready’, đóng chương trình và khởi động lại. Nếu xuất hiện ‘Hệ thống sẵn sàng-System is ready’, máy tính đã kết nối thành công với thiết bị.
- Để lập chương trình chạy, nhấp ‘File - Design Experiment’ trên thanh Menu.
- Khi cửa sổ ‘Select Diagnostics Kit’ mở ra, chọn ‘MTB & NTM Real-Time PCR Kit’.
- Tiếp đó, tìm Bản đồ mẫu đã lưu ở bước 13, nhấp ‘Open’.
- Khi cửa sổ ‘Sample Assign View’ mở ra, hãy xác nhận các vị trí vật lý nơi đặt các dây ống PCR trong máy phù hợp với Bản đồ mẫu rồi nhấn ‘OK’.

Chú ý: Nếu cần thay đổi cách hiển thị đĩa, nhấp “Edit” và thực hiện các thay đổi cần thiết. Hoàn thành, nhấp “Update”, phần mềm sẽ hỏi ‘**Do you save your changes to Excel File?**’, nếu muốn thay đổi vĩnh viễn, chọn ‘**Yes(Y)**’ và tiếp tục chọn đĩa ‘*.xls’ gốc. Chọn ‘**Yes(Y)**’ khi phần mềm hỏi bạn có muốn thay thế file ban đầu.

- Khi cửa sổ ‘Quick Start...’ mở ra, xác nhận những thông tin về quy trình PCR (trên ‘Protocol’ tab) và hiển thị mẫu (trên ‘Plate’ tab) và nhấp ‘OK’ nếu mọi thông tin chính xác.
- Để thực hiện phản ứng, nhấp vào nút ‘▶’ button trên thanh công cụ.

Chú ý: File kết quả (.ex3) sẽ được lưu tự động theo ngày trên máy.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC)

Chỉ trả kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- + Kết quả mẫu chứng: Nếu giá trị MTB và NTM Ct của mỗi chứng nằm trong phạm vi được chỉ định của nó, thì nó được gán cờ 'Valid'. Nếu kết quả chứng được gán cờ "Invalid", hãy thực hiện lại xét nghiệm

4.2.2. Đọc kết quả

- Mở chương trình ‘Analysis’ có biểu tượng trên màn hình.
- Chọn File>Open, chọn tiếp file (.ex3), file kết quả được lưu trữ trong thư mục.
- Rất nhiều tab sẽ hiển thị như dưới đây. ‘MTB & NTM Real-Time PCR Kit’ tab được hiển thị như đã xuất hiện lúc đầu.
- Tab ‘MTB & NTM Real-Time PCR Kit’ sẽ hiển thị giá trị Ct được phân tích.
- Well: Vị trí các giếng đối chứng (PC, IPC) và mẫu trên khối nhiệt 96 giếng.
- Sample ID: NTC (chứng âm), PC (chứng dương) và tên mẫu đã đưa vào trong Bản đồ mẫu.
- IPC Result: Hiệu lực IPC (chứng nội) tính theo giá trị Ct IPC của từng giếng. Nếu giá trị trong khoảng (cho sẵn) sẽ được gán cờ ‘Valid’, nếu ngoài khoảng sẽ gán cờ ‘Invalid’.
- Target Ct: Giá trị Ct MTB & NTM từng giếng, nếu xét nghiệm có giá trị, NTC sẽ được gán cờ ‘Undetermined’ và giá trị Ct PC sẽ ở trong khoảng.
- Kết quả cuối cùng: Trình bày kết quả cuối cùng của các đối chứng và mẫu.
 - + Kết quả mẫu chứng: Nếu giá trị MTB và NTM Ct của mỗi chứng nằm trong phạm vi được chỉ định của nó, thì nó được gán cờ 'Valid'. Nếu kết quả chứng được gán cờ "Invalid", hãy thực hiện lại xét nghiệm.
 - + Kết quả mẫu bệnh phẩm: Kết quả mẫu được gán cờ “Detected” hoặc “Non-Detected” theo giá trị Ct của MTB và NTM.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:

$\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

$\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

$\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

$\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT).

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

11. Xét nghiệm phát hiện trứng giun sán bằng phương pháp lắng cặn phân

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện trứng giun sán trong mẫu phân bệnh nhân bằng kỹ thuật lắng cặn.

1.2. Nguyên lý

Mẫu phân được hòa tan với nước và để lắng tự nhiên. Trong cặn lắng có chứa các ký sinh trùng có trong phân. Phương pháp này cho phép phát hiện các loại đơn bào, trứng giun, ấu trùng và trứng sán.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Nước pha glycerin 0,5%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Que gỗ xử lý bệnh phẩm
- Tăm bông xử lý bệnh phẩm
- Lam kính
- Lamen
- Ly có chân
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Cốc đựng rác thải y tế
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Đồng hồ bấm giờ
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

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

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

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

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

Các bước	Nội dung
1	Lấy mẫu phân vào ly, cho thêm lượng nước hoặc nước có pha glycerin 0,5% gấp 10 lần lượng mẫu.
2	Khuấy đều phân trong ly có chân, để lắng 1 giờ.
3	Đổ bỏ phần nước nổi bên trên.
4	Thêm nước, khuấy đều, để lắng 1 giờ, gạn bỏ phần nước nổi.
5	Lập lại nhiều lần cho đến khi nước bên trên trong hẳn.

Các bước	Nội dung
6	Bỏ phần nước nổi.
7	Khuấy đều phần cặn, lấy 1 hoặc 2 giọt cặn quan sát dưới kính hiển vi.

4.2. Nhận định kết quả

- Âm tính: Không thấy trứng giun sán.
- Dương tính: Trả kết quả theo loại trứng giun, sán.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

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

12. *Helicobacter pylori* kháng thuốc định lượng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định mức độ nhạy cảm và nồng độ ức chế tối thiểu của 6 loại kháng sinh (amoxicillin, clarithromycin, levofloxacin, metronidazole, tetracycline và rifampicin) với chủng *Helicobacter pylori*.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dải giấy kháng sinh có kích thước 5 x 57 mm được thấm kháng sinh theo bậc nồng độ ($\mu\text{g/mL}$). Có 15 nồng độ kháng sinh được pha loãng bậc 2 gắn cố định ở một mặt của dải giấy. Khi dải giấy kháng sinh được đặt lên mặt thạch đã dàn vi khuẩn, kháng sinh nhanh chóng khuếch tán trong thạch. Sau khi nuôi cấy qua đêm, sẽ xuất hiện vùng ức chế hình elip đối xứng qua dải giấy. Giá trị MIC được xác định tại điểm cắt của hình elip với dải giấy kháng sinh. Giá trị MIC sẽ được phiên giải ra phân loại **S** (susceptibility – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng) theo hướng dẫn của EUCAST cập nhật hàng năm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Dải giấy kháng sinh (6 loại kháng sinh)
- Canh thang Brucella
- Thạch máu có chất dinh dưỡng bổ sung
- Thạch Muller-Hinton F (MHF)
- Túi tạo khí trường vi hiếu khí
- Túi tạo khí trường kỵ khí (cho thử nghiệm metronidazol)
- Ống canh thang BHI 15% glycerol
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μL tiết trùng
- Đầu côn 200 μL tiết trùng
- Bút viết không xóa
- Que cấy

- Ống nghiệm thủy tinh
- Tăm bông vô trùng
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp nuôi cấy vi hiếu khí
- Panh
- Bộ độ đục chuẩn McFarland
- Micropipette
- Chủng vi khuẩn chuẩn
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Tủ ẩm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp tiệt trùng
- Tủ sấy
- Máy đo pH
- Máy đo độ đục
- Máy vortex
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chủng vi khuẩn *H. pylori* cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh trên môi trường không có chất chọn lọc.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm và vị trí lấy mẫu (nếu có), mã bệnh phẩm, loài vi khuẩn yêu cầu làm kháng sinh đồ.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 96 giờ (4 ngày).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

- *Pha huyền dịch vi khuẩn:* Dùng que cấy lấy khuẩn lạc vi khuẩn có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống canh thang Brucella (hoặc canh thang khác tương đương), lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất và có độ đục bằng với độ đục của ống McFarland 3,0. (Không để đĩa cấy vi khuẩn ra ngoài môi trường quá 30 phút cho đến lúc lấy khuẩn lạc).
- *Dàn đều canh khuẩn lên mặt đĩa thạch:* Nhỏ 100 µl huyền dịch vi khuẩn lên mặt thạch MHF, dùng tăm bông vô ria đều huyền dịch vi khuẩn trên toàn bộ mặt đĩa thạch MHF sao cho vi khuẩn được dàn đều lên trên toàn bộ bề mặt đĩa thạch.
- *Đặt các khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch:* Đặt dải giấy kháng sinh lên mặt thạch sao cho mặt có ghi dải nồng độ hướng lên trên và phải đảm bảo toàn bộ bề mặt của dải giấy kháng sinh được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch (mỗi đĩa thạch đặt không quá 2 dải giấy). Khi đã đặt xong dải giấy kháng sinh không được dịch chuyển dải giấy kháng sinh khỏi vị trí.
- *Ủ ấm:* Đĩa thạch trong hộp kín có chứa túi tạo môi trường vi hiếu khí rồi đặt hộp vào tủ ấm 35-37°C trong 72 giờ. Đĩa thử nghiệm metronidazole được đặt trong hộp kín có chứa túi tạo môi trường kỵ khí nếu 1 ngày sau đó chuyển sang môi trường vi hiếu khí.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả kháng sinh đồ chủng bệnh nhân khi kết quả QC đạt.

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

- Sau 72 giờ thấy rõ vi khuẩn mọc, đọc giá trị MIC ở điểm cắt của hình elip với dải giấy kháng sinh. Làm tròn giá trị MIC ở điểm giữa hai bậc pha loãng lên giá trị cao hơn một bậc trước khi phiên giải kết quả.
- Phiên giải kết quả MIC ra giá trị S, I hoặc R theo tài liệu hướng dẫn của EUCAST cập nhật hàng năm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Lần hai hay nhiều chủng vi khuẩn.
- Vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.
- Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng hàng tuần, mỗi khi nhận lô kháng sinh mới, lô môi trường mới, mỗi lần nhận sinh phẩm, hóa chất phải đạt yêu cầu theo hướng dẫn của EUCAST phiên bản cập nhật hàng năm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

13. *Mycoplasma pneumoniae* Ab ngưng kết hạt

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch phát hiện các kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* trong huyết thanh người bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ngưng kết kháng nguyên-kháng thể. Sử dụng hạt nhân tạo có ái lực với các thành phần của màng tế bào *Mycoplasma pneumoniae*. Các hạt bị ngưng kết khi có mặt của các kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* trong huyết thanh người và lắng xuống bề mặt của giếng phản ứng tạo thành các vòng tròn rộng và có thể phát hiện được bằng mắt thường.
- Nồng độ kháng thể của mẫu dương tính tiếp tục được xác định bằng phương pháp pha loãng bán định lượng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hoá chất phát hiện kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae* ngưng kết hạt bao gồm: dung dịch pha loãng mẫu: sử dụng để pha loãng mẫu và hoàn nguyên các hạt có ái lực và hạt không có ái lực với kháng nguyên; lọ chứa hạt có ái lực (dạng đông khô): các hạt nhạy cảm với kháng nguyên của *mycoplasma pneumoniae*; lọ chứa hạt không có ái lực (dạng đông khô): các hạt không nhạy cảm với kháng nguyên của *mycoplasma pneumoniae*; chứng dương (dạng dung dịch): huyết thanh dương tính với kháng thể kháng *mycoplasma pneumoniae*; ống nhỏ giọt để lấy sinh phẩm
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch rửa tay
- Phiến nhựa có giếng thực hiện phản ứng
- Đầu côn (tip) 10 µl – 100 µl tiệt trùng
- Tiêu hao vật tư cho chạy chứng kiểm tra chất lượng
- khay đựng bệnh phẩm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/ kỹ thuật y
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy li tâm tốc độ 3000-5000 vòng/phút để xử lý mẫu
- Máy lắc/rung phiên nhựa tự động để tối ưu hóa phản ứng kháng nguyên -kháng thể
- Pipette 10 µl -100 µl với đầu côn phù hợp để thực hiện xét nghiệm
- Đồng hồ tính phút (đồng hồ bấm giây)
- Tủ lạnh/ tủ bảo quản sinh phẩm 2°C – 8°C bảo quản sinh phẩm và lưu mẫu
- Nhiệt kế kiểm soát nhiệt độ tủ lạnh
- Nhiệt ẩm kế kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm môi trường
- Nồi hấp tiệt trùng bằng hơi nước xử lý mẫu bệnh phẩm sau xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu theo quy trình nhận mẫu tại đơn vị.
- Loại mẫu bệnh phẩm: huyết thanh của người bệnh
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Mẫu máu chứa trong ống nghiệm (tube) nhựa 2ml có hạt mịn tách huyết thanh. Thể tích mẫu tối thiểu 1 ml.
 - + Mẫu không bị nhiễm bẩn, vỡ hồng cầu, mỡ máu cao
- Xử lý bệnh phẩm: tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm và quy trình của phòng xét nghiệm.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 180 phút (3 giờ)

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

Các bước	Nội dung
1	Hoàn nguyên lọ chứa hạt có ái lực, hạt không có ái lực bằng dung dịch pha loãng mẫu theo thể tích đã quy định trên nhãn lọ trước khi thực hiện phản ứng
2	Tiến hành xét nghiệm định tính
2.1	Ghi mã bệnh phẩm vào ô vị trí thực hiện phản ứng trên phiên nhựa, mỗi xét nghiệm cần 3 giếng.
2.1	Sử dụng pipette hút các thể tích dung dịch pha loãng mẫu nhỏ vào các giếng theo hướng dẫn của nhà sản xuất
2.2	Thêm thể tích mẫu huyết thanh vào giếng số 1, trộn đều.
2.3	Hút thể tích huyết thanh đã được pha loãng ở giếng số 1 thêm vào giếng số 2, trộn đều. Tiếp tục hút thể tích huyết thanh đã pha loãng ở giếng số 2 thêm vào giếng số 3, trộn đều và hút bỏ thể tích thừa ở giếng số 3.
2.4	Sử dụng ống nhỏ giọt được cung cấp cùng bộ hóa chất hút dung dịch hạt không có ái lực nhỏ 1 giọt vào giếng thứ 2 để tạo giếng chứng âm. Sử dụng ống nhỏ giọt khác hút dung dịch hạt có ái lực nhỏ 1 giọt vào giếng thứ 3.
2.5	Hút trộn cho mỗi giếng bằng Pipette với đầu côn riêng biệt
2.6	Phủ khay giếng phản ứng bằng tấm nhựa và ủ ở khoảng nhiệt độ và thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
3	Tiến hành xét nghiệm bán định lượng (khi phản ứng dương tính)
3.1	Ghi mã bệnh phẩm vào ô vị trí thực hiện phản ứng trên phiên nhựa. Mỗi xét nghiệm cần 8 giếng hoặc hơn (nếu ở giếng số 8 vẫn có hiện tượng ngưng kết)
3.2	Sử dụng pipette hút các thể tích dung dịch pha loãng mẫu nhỏ vào các giếng theo hướng dẫn của nhà sản xuất
3.3	Thêm thể tích mẫu huyết thanh vào giếng số 1, trộn đều.
3.4	Hút thể tích huyết thanh đã được pha loãng ở giếng số 1 thêm vào giếng số 2, trộn đều. Thực hiện tương tự đến giếng số 8 và hút bỏ thể tích thừa ở giếng số 8.

Các bước	Nội dung
3.5	Sử dụng ống nhỏ giọt được cung cấp cùng bộ hóa chất hút dung dịch hạt không có ái lực nhỏ 1 giọt vào giếng thứ 2 để tạo giếng chứng âm. Sử dụng ống nhỏ giọt khác hút dung dịch hạt có ái lực nhỏ 1 giọt vào giếng thứ 8.
3.6	Hút trộn cho mỗi giếng bằng pipette với đầu côn riêng biệt
3.7	Phủ khay giếng phản ứng bằng tấm nhựa và ủ ở khoảng nhiệt độ và thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Thực hiện nội kiểm song song cho mỗi lần xét nghiệm
	Thực hiện 2 giếng chứng kiểm soát: - Chứng âm: sử dụng dung dịch pha loãng với hạt không có ái lực - Chứng dương: thực hiện kỹ thuật với mẫu chứng dương cung cấp theo bộ sinh phẩm tương tự như mẫu người bệnh

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

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

- Chứng âm: Không có hiện tượng ngưng kết trên nền giếng phản ứng, nút cô đặc rõ rệt ở tâm giếng với viền tròn ngoài trơn nhẵn.
- Chứng dương: Có hiện tượng ngưng kết trên nền giếng phản ứng, các hạt ngưng kết lắng đọng tạo thành các vòng tròn rộng rõ rệt

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

- Không có hiện tượng ngưng kết ở giếng phản ứng số 3: **Không có kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae***
- Có hiện tượng ngưng kết ở giếng số 3 trên nền giếng phản ứng (hạt ngưng kết lắng đọng tạo thành vòng tròn rộng rõ rệt/ trải rộng bao phủ toàn bộ nền giếng): **Có kháng thể kháng *Mycoplasma pneumoniae*** (nồng độ kháng thể tương ứng với bậc pha loãng ở giếng có phản ứng ngưng kết xảy ra)
- Hiện tượng ngưng kết trên nền giếng không rõ ràng ở giếng phản ứng số 3 (hạt ngưng kết lắng đọng tạo thành vòng tròn nhỏ với viền ngoài vòng tròn trơn nhẵn): thực hiện lại xét nghiệm bằng phương pháp khác hoặc với một mẫu bệnh phẩm mới.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển mẫu bệnh phẩm và bảo quản mẫu không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.	- Tùy từng trường hợp cụ thể, có thể lấy lại mẫu bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm nếu cần.
- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn. - Độ nhạy của kết quả giảm nếu sinh phẩm hóa chất không được thực hiện ở nhiệt độ quy định - Sinh phẩm hoá chất bị hư hỏng, hết hạn.	- Thực hiện lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất. - Đảm bảo độ ổn định hoá chất xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khuyến cáo hóa chất được đưa về nhiệt độ phòng xét nghiệm trước khi sử dụng. - Thực hiện lại xét nghiệm với hóa chất sinh phẩm còn hạn sử dụng và đảm bảo chất lượng.
- Đọc và nhận định kết quả phản ứng sau thời gian khuyến cáo, kết quả bán định lượng có thể không chính xác - Phiên giải, báo cáo và trả kết quả có thể xảy ra nhầm lẫn.	- Đọc kết quả trong khoảng thời gian khuyến cáo của nhà sản xuất sinh phẩm - Thông báo tới Bác sĩ lâm sàng để trả kết quả đúng cho người bệnh và phải có hành động phòng ngừa phù hợp

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

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

14. EHEC miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện sự có mặt của kháng nguyên vi khuẩn Escherichia coli sinh độc tố trong mẫu bệnh phẩm huyết thanh/huyết tương người bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Kháng nguyên vi khuẩn Escherichia coli kết hợp với thuốc thử chứa kháng thể kháng Escherichia coli được gắn với một số chất hóa học tạo thành hỗn hợp thuốc mang phức hợp miễn dịch. Hỗn hợp này được đưa vào ngăn đếm, tại đây chúng được kích thích phát sáng bằng điện áp. Sự có mặt của kháng nguyên vi khuẩn Escherichia coli được đánh giá qua cường độ ánh sáng phát ra.

Định nghĩa

- Calibrators: Mẫu chuẩn.
- Controls: Mẫu chứng

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Controls
- Calibrators
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Vật tư cần thiết khác tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng 5-10ml
- Bông tiêm

- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy miễn dịch tự động và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

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

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 60 phút đến 90 phút.

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

Bước 1: chuẩn bị

- Kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy. Chuẩn bị các hóa chất kèm theo.
- Kiểm tra hiệu chuẩn máy
- Chạy các chứng chuẩn
- Ly tâm ống máu 3000 vòng/10 phút

Bước 2: chạy mẫu

Chạy mẫu không dùng barcode

- Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm.
- Hút huyết thanh/huyết tương vào cốc đựng mẫu tương ứng.
- Vào màn hình thao tác theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Nhập mã bệnh phẩm, tên bệnh nhân và ngày thực hiện xét nghiệm.
- Chọn test CAMPYLO.
- Nhập số rack và vị trí mẫu.
- Đặt mẫu huyết thanh bệnh nhân cần xét nghiệm (hoặc cốc chứa mẫu bệnh phẩm) lên Rack đúng vị trí đã order và đưa vào khu nạp giá mẫu.
- Tiếp tục chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Chạy mẫu có dùng barcode

- Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Quản lý thông tin xét nghiệm.
- Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack quy định, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
- Tiếp tục chạy mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

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

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm (QC):

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

4.2.2. Đọc kết quả:

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

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Trang thiết bị không được vệ sinh hàng ngày, bảo trì, bảo dưỡng định kỳ.

Xử trí:

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

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

15. HBeAg định lượng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên và định lượng kháng nguyên HBeAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh (huyết tương) người.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA- miễn dịch hóa phát quang.

Định nghĩa

- RLU: Relative Light Unit- đơn vị ánh sáng tương đối
- CLIA: Chemiluminescent Immuno Assay- kỹ thuật hóa phát quang
- HBeAg: Kháng nguyên HBeAg của virus viêm gan B

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm xét nghiệm phát hiện và định lượng HBeAg bằng kỹ thuật CLIA
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch rửa dùng cho phản ứng
- Dung dịch chứa hóa chất phát quang, hóa chất huỳnh quang
- Dung dịch rửa kim đo và/hoặc các kim hút khác (kim hút mẫu, kim hút hóa chất...)
- Dung dịch rửa máy
- Tube đựng bệnh phẩm
- Pipet hút bệnh phẩm
- Đầu côn sử dụng cho máy và hoặc cup sử dụng cho máy
- Túi/hộp/khay đựng rác thải cho máy
- Cup hút mẫu sử dụng cho máy
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Dây garo

- Bông
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Dàn máy miễn dịch tự động.
- Máy ly tâm thường
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương người
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.
- Từ chối mẫu trong trường hợp mẫu không đủ tiêu chuẩn quy định

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm đảm bảo đầy đủ thông tin theo quy định. Phiếu chỉ định xét nghiệm phải có loại bệnh phẩm.

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

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

3. AN TOÀN

- Phòng xét nghiệm thực hiện cấp độ ATSH theo công bố phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám chữa bệnh. Yêu cầu tối thiểu phù hợp loại kỹ thuật xét nghiệm: phòng ATSH cấp độ 2.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy miễn dịch tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng PXN.

Các bước	Xét nghiệm định lượng Alinity i HBeAg
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa. Nạp thêm thuốc thử để cho đủ số lượng chạy trong ngày. Chuẩn bị thuốc thử trước khi đưa vào theo hướng dẫn của nhà sản xuất
2	Vào Reagent để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn: + Nếu tại vị trí có ô HBeAg hiển thị dòng chữ no cal có nghĩa đó là lô thuốc thử mới cần phải hiệu chuẩn. + Khi cần thiết như khi chạy chứng HBeAg thấy kết quả vượt ra ngoài dải giới hạn cho phép.
3	Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên thì tiến hành chạy chứng HBeAg control bao gồm 2 mức: HBeAg control L và HBeAg control M và HBeAg control H Đánh giá kết quả QC đạt, tiến hành chạy mẫu bệnh phẩm
5	Chạy mẫu theo các bước sau:
6	Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu bệnh nhân 3000 vòng trong 10 phút.
Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 7-11:	
7	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng.
8	Vào màn hình ORDERS → CREATE ORDERS → SINGLE SPECIMEN .
9	Nhập + R/P : vị trí mẫu trên khay + SID : mã số bệnh nhân - Chọn xét nghiệm / panel là HBeAg Quant - Nhấn ADD ORDER .
10	Đưa khay mẫu vào khu nạp giá mẫu ở vị trí chạy mẫu bệnh nhân thường quy.

11	- Chuyển máy sang chế độ RUNNING nếu máy đang ở IDLE .
Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 12-14:	
12	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Quản lý thông tin xét nghiệm
13	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu trắng, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
14	Nhấn RUN (F8)

4.2. Nhận định kết quả

Nhận định kết quả dựa trên đánh giá tiêu chuẩn của nhà sản xuất, tiêu chuẩn quản lý chất lượng của từng PXN và hướng dẫn cách biện luận kết quả của nhà sản xuất và các hướng dẫn chẩn đoán, điều trị liên quan của Bộ Y tế.

Nhận định kết quả xét nghiệm HBeAg bằng bộ sinh phẩm Alinity i HBeAg

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất
 - + Chạy kiểm tra chứng HBeAg control L, HBeAg control M, HBeAg control H trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
 - + Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định của nhà sản xuất.
- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm
 - + Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm.
- Kết quả và báo cáo
 - + Máy sẽ tự động tính toán giá trị định lượng HBeAg dựa vào tín hiệu RLU của mẫu, đường cal để xác định nồng độ HBeAg trong mẫu theo đơn vị PEI U/mL (IU/mL).
 - + Khoảng đo của xét nghiệm Alinity i HBeAg là từ 0.59 đến 700.00 PEI U/mL (IU/mL).

Kết quả được diễn giải như sau:

- + Nếu nồng độ đo của mẫu < 0.59 PEI U/mL : mẫu nên được chạy lại với xét nghiệm HBeAg định tính và biện luận kết quả theo xét nghiệm định tính HBeAg.
- + Nếu $COI \geq 0.59$ PEI U/mL và ≤ 700.00 PEI U/mL: trả kết quả theo nồng độ đã được đo trên máy VD: nồng độ HBeAg là 550 PEI U/mL hoặc 550 IU/mL
- + Nếu nồng độ đo của mẫu > 700.00 PEI U/mL cần tiến hành pha loãng mẫu tự động hoặc bằng tay bằng với dung dịch pha loãng Alinity i Multi-Assay Manual Diluent. Pha loãng tự động, máy tự động tính toán theo tỷ lệ pha loãng. Pha loãng bằng tay người vận hành phải nhập hệ số pha loãng vào màn hình đặt lệnh (Create Order) Mẫu bệnh phẩm (Specimens) hay Mẫu chứng (Control). Hệ

thống sẽ sử dụng hệ số pha loãng này để tự động tính nồng độ mẫu và báo cáo kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Sử dụng các ống mẫu không đúng theo yêu cầu của nhà sản xuất (VD các ống mẫu không phù hợp kích thước chạy máy, các ống mẫu chứa chất chống đông không có trong khuyến cáo của nhà sản xuất)
- Xử trí: Thực hành theo Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu hoặc quy trình lấy mẫu của PXN

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng bao gồm hạn sử dụng ghi trên bao bì và hạn sử dụng sau khi mở nắp.
- Các thao tác chuẩn bị hóa chất chưa đúng làm tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, chất chuẩn và chứng).
- Bảo quản hóa chất và vật tư không đúng điều kiện yêu cầu của nhà sản xuất
- Tần suất thực hiện nội kiểm không đúng theo khuyến cáo nhà sản xuất hoặc không thực hiện nội kiểm
- Bỏ sót các lưu ý, khuyến cáo trong sử dụng máy, hóa chất sinh phẩm của nhà sản xuất
- Xử trí: đọc kỹ và tuân thủ hướng dẫn, lưu ý, khuyến cáo của nhà sản xuất

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

16. HIV Ab ngưng kết hạt

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện định tính, bán định lượng kháng thể kháng HIV-1 và/hoặc HIV-2 trong huyết thanh hoặc huyết tương người bằng kỹ thuật ngưng kết hạt vi lượng.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật ngưng kết hạt vi lượng. Kháng thể kháng HIV-1 và/hoặc HIV-2 nếu có trong mẫu bệnh phẩm sẽ kết hợp với kháng nguyên tái tổ hợp HIV-1 (HIV-1/gp41 và HIV-1/p24) và HIV-2 (HIV-2/gp36) được gắn trên hạt gelatin tạo hiện tượng ngưng kết.

Định nghĩa: HIV: Human Immunodeficiency Virus: Virus gây suy giảm miễn dịch ở người.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm Serodia HIV 1/2 Mix (VD hoặc tương đương)
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn 1000 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-200 μ L tiệt trùng
- Đầu côn 1-20 μ L tiệt trùng
- Phiến nhựa đáy chữ U
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Bông vô trùng
- Panh

- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy ly tâm thường
- Máy ủ
- Bộ lưu điện
- Máy lắc tròn
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu - 20°C
- Tủ lạnh âm sâu - 70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bộ pipetman 8 kênh
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

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

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

Ví dụ: Bộ sinh phẩm Serodia HIV 1/2 Mix (VD hoặc tương đương)

Các bước	Nội dung
Xét nghiệm định tính HIV	
1	Đề sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Hồi chỉnh thuốc thử Cho 0,6ml dung dịch ở lọ A vào lọ có gắn kháng nguyên HIV (Lọ C) Cho 1ml dung dịch ở lọ A vào lọ không gắn kháng nguyên HIV (Lọ D) Trộn đều bằng cách lắc nhẹ và xoay ngược chiều trước khi sử dụng.
3	Đánh số (dán)code, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
4	Chuẩn bị phiến nhựa và đánh số phiến
5	Nhỏ 75µl dung dịch pha loãng mẫu vào giếng số 1 và 25µl dung dịch này vào các giếng số 2 và số 3. Đối với chứng dương cho tiếp 25µl dung dịch pha loãng vào giếng 4 và 5. Đối với xét nghiệm chất thử chứng, cho 25µl dung dịch pha loãng vào giếng số 1 và 2
6	Nhỏ 25µl bệnh phẩm huyết thanh vào giếng số 1. Trộn đều bằng cách hút nhỏ lên xuống từ 5-6 lần. Hút chuyển 25µl dung dịch đã pha loãng từ giếng 1 sang giếng 2. Trộn chất thử của giếng 2 theo cách như mô tả ở trên và chuyển 25µl vào giếng số 3. Làm quy trình giống như trên, trộn chất thử của giếng 3 và loại bỏ 25µl dung dịch sau khi trộn. Đối với chứng dương, tiến hành tương tự cho tới giếng thứ 5 Không cho huyết thanh vào giếng đối với xét nghiệm chất thử chứng
7	Sử dụng ống nhỏ giọt màu đỏ, nhỏ 25µl (1 giọt) dung dịch treo có hạt không gắn KN (hạt chứng) vào giếng số 2. Dùng ống nhỏ giọt xanh nhỏ 25µl (1 giọt) dung dịch treo có hạt gắn KN (hạt nhạy)vào giếng 3. Đối với chứng dương, nhỏ 25µl (1 giọt) dung dịch treo có hạt không gắn KN vào giếng số 2 và 25µl (1 giọt) dung dịch treo có hạt gắn KN vào giếng 3, 4, 5. Đối với xét nghiệm chứng thử, nhỏ 25µl (1 giọt) dung dịch treo có

Các bước	Nội dung
	hạt không gắn KN vào giếng số 1 và nhỏ 25 μ l (1 giọt) dung dịch treo có hạt gắn KN vào giếng 2
8	Lắc đều các thành phần trong giếng (bằng máy lắc rung tự động) hoặc bằng cách dùng ngón tay gõ vào 4 góc phiến nhựa từ 5-6 lần.
9	Đậy phiến nhựa lại và đặt lên 1 bề mặt không rung ở nhiệt độ phòng (15-30 $^{\circ}$ C) trong thời gian 2 giờ và đọc kết quả. Trường hợp đọc kết quả có ngưng kết ở cả giếng nhỏ dung dịch treo có hạt gắn và không gắn KN, thực hiện phản ứng hấp phụ theo các bước tiến hành phản ứng hấp phụ
Phản ứng hấp phụ	
10	Cho 0.35ml dung dịch treo không gắn KN (các hạt chứng) đã hồi chỉnh vào ống xét nghiệm nhỏ.
11	Cho tiếp 50 μ l huyết thanh vào ống và trộn thật đều bằng máy trộn quay tròn. Ủ ở nhiệt độ phòng (15-30 $^{\circ}$ C) ít nhất là 20 phút.
12	Ly tâm trong vòng 5 phút với tốc độ 200 vòng/ phút. Sau đó hút ra 50 μ l phần nổi (pha loãng mẫu huyết thanh đã hấp thụ ở 1:8) và nhỏ vào giếng số 2.
13	Sau đó hút 25 μ l mẫu phẩm đã hấp thụ từ giếng 2 nhỏ vào giếng 3 và trộn đều theo hướng dẫn cho xét nghiệm định tính.
14	Tiếp tục thực hiện như các bước 7; 8 và 9.

Bảng 1: Xét nghiệm định tính.

Giếng số...	1	2	3
Dung môi pha loãng mẫu (μ l)	75	25	25
Mẫu huyết thanh	25	25	25
Pha loãng mẫu	1:4	1:8	1:16
Hạt chứng (μ l)		25	
Hạt gắn nhạy (μ l)			25
Độ pha loãng cuối cùng		1:16	1:32
Dùng máy lắc rung tự động hoặc bằng tay để trộn đều, đậy phiến lại, ủ trong 2 giờ			
Đọc kết quả			

Loại bỏ
25 μ l

Bảng 2: Xét nghiệm đối với chứng dương

Giếng số...	1	2	3	4	5
Dung môi pha loãng mẫu (μl)	75	25	25	25	25
Mẫu huyết thanh hoặc Chứng dương (μl)	25	25	25	25	25
Pha loãng mẫu	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Hạt chứng (μl)		25			
Hạt gắn nhạy (μl)			25	25	25
Pha loãng cuối cùng		1:16	1:32	1:64	1:128
Dùng máy máy lắc rung tự động hoặc bằng tay để trộn đều, đập phiên lại, ủ trong 2 giờ					
Đọc kết quả					

Bảng 3 – Phương pháp thực hiện xét nghiệm chất thử chứng.

Giếng số....	1	2
Dung môi pha loãng mẫu (μl)	25	25
Các hạt chứng (μl)	25	
Các hạt gắn nhạy (μl)		25
Trộn bằng máy trộn khay (máy lắc rung tự động), đập khay lại và ủ trong vòng 2 giờ		
Giải thích kết quả		

4.2. Nhận định kết quả**4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm**

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả**Đọc và nhận định độ ngưng kết:**

Độ ngưng kết có thể đọc bằng mắt thường hoặc bằng cách cẩn thận đặt khay lên máy đọc khay phù hợp, tránh ánh sáng trực tiếp và so sánh với phần ngưng kết của chất thử chứng.

Bảng 4: Đọc và nhận định kết quả.

Hình thành các mô hình hạt	Đọc	Nhận định
Các hạt tập trung lại với nhau thành hình nút ở giữa giếng và có 1 đường viền mỏng nhẹ ở xung quanh	(-)	Âm tính
Các hạt tập trung lại với nhau thành hình nhẵn kết đặc và có 1 đường viền mỏng nhẹ ở xung quanh	(±)	Không xác định (xem ghi chú ở dưới)
Các hạt tạo thành hình nhẵn lớn có đường viền cứng nhiều hình dạng xung quanh. Phần kết dính xuất hiện ở ngoại vi.	(+)	Dương tính
Các hạt kết dính bám chặt và trải rộng lên toàn bộ các đáy giếng	(++)	Dương tính

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật**

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.

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

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.
- Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Ví dụ: hemoglobin, lipid máu, bilirubin máu, một số loại thuốc...) hoặc có phản ứng chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

17. Xét nghiệm phân bằng phương pháp Katokatz

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định số lượng trứng giun sán trong phân bằng kỹ thuật Xét nghiệm phân bằng phương pháp Kato - Katz.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Trứng giun sán được tập trung bằng phương pháp làm dày tiêu bản phân với giấy Cellophan và soi đếm trên kính hiển vi không dầu. Từ đó tính ra số lượng trứng giun sán trong 1 gram phân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Giấy Cellophan
- Dung dịch xanh malachit 3%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Lam kính
- Que xét nghiệm
- Lưới lọc
- Miếng bìa hình chữ nhật kích thước 30x40 x1,37mm, ở giữa có lỗ trong 6mm
- Giấy lọc
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Nút cao su
- Kẹp
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm 35°C - 37°C
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, nắp kín, được dán nhãn ghi đầy đủ thông tin theo quy định.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu, bảo quản và vận chuyển mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định, đúng với các thông tin dán trên lọ đựng mẫu bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 120 phút (2 giờ).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

- Lấy mẫu phân xét nghiệm đặt trên giấy lọc. Đặt miếng lưới lọc lên mẫu phân, dùng que ép miếng lưới lọc để phân lọt qua lưới lọc.
- Miếng bìa hình chữ nhật được đặt trên phiến kính có nhãn.
- Dùng que gạt phần phân đã lọc lưới đưa sang lỗ của miếng bìa hình chữ nhật sao cho phân đầy lỗ.
- Nhấc nhẹ miếng bìa ra khỏi phiến kính như vậy còn lại khối phân trên phiến kính.
- Đặt miếng giấy Cellophan đã nhuộm màu lên mẫu phân.
- Dùng một nút cao su ép nhẹ lên mặt giấy để dàn phân đều, sao cho mặt giấy tương đối phẳng nhẵn.

- Để tiêu bản trong phòng thí nghiệm 30 phút hoặc trong tủ ẩm 37°C trong 15-20 phút.
- Sau đó đem soi dưới kính hiển vi.

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: thấy hình ảnh trứng giun sán (mẫu phân trong, trứng giun gián không bị trong sẽ thấy rõ trên nền xanh).
 - o Tính số lượng trứng trong 1 gam phân: biết rằng số lượng phân chứa trong lỗ tròn tương đương 43.7mg. Như vậy số trứng trong 1 gam phân chính là số trứng đếm được trên tiêu bản nhân 23.
 - o Đánh giá cường độ nhiễm giun đũa, giun tóc, giun móc/mỏ theo số lượng giun ký sinh và số trứng tính được trong 1 gam phân theo qui ước của Tổ chức Y tế Thế giới.
- Âm tính: không thấy trứng giun sán

4.3. Trả kết quả và lưu hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Cho giấy Cellophan ngâm vào dung dịch nhuộm trên 24 giờ trước khi dùng, không nên nhúng sẵn trước thời gian sử dụng quá lâu.
- Soi lam kính theo hình zíc zắc, tránh bỏ sót vi trường.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

18. Xét nghiệm phát hiện trứng giun sán trong phân bằng phương pháp Kato

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện trứng giun sán (giun đũa, giun móc/mỏ, giun tóc) trong bệnh phẩm phân bằng phương pháp Kato.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Trứng giun sán được tập trung bằng phương pháp làm dày tiêu bản phân với giấy Cellophan và soi đếm trên kính hiển vi không dầu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Giấy cellophan
- Dung dịch xanh malachit 3%
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Lọ đựng bệnh phẩm
- Lam kính
- Que xét nghiệm
- Lưới lọc
- Miếng bìa hình chữ nhật kích thước 30x40 x1,37mm, ở giữa có lỗ trong 6mm
- Giấy lọc
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Nút cao su
- Kẹp
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ

- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm 35 - 37°C
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Tủ lạnh 2 - 8°C
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: phân được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, nắp kín, được dán nhãn ghi đầy đủ thông tin theo quy định.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu, bảo quản và vận chuyển mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định, đúng với các thông tin dán trên lọ đựng mẫu bệnh phẩm.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 90 phút (1,5 giờ).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

- Lấy một lượng phân khoảng 50-60mg (khoảng bằng hạt ngô) đặt lên lam kính đã có nhãn ghi tên, tuổi bệnh nhân.
- Đậy miếng giấy Cellophan đã nhuộm màu lên mẫu phân.
- Dùng một nút cao su ép nhẹ lên mặt giấy để dàn phân đều, sao cho mặt giấy tương đối phẳng nhẵn.
- Để tiêu bản trong phòng thí nghiệm 30 phút hoặc trong tủ ấm 37°C trong 15-20 phút.
- Sau đó đem soi dưới kính hiển vi (vật kính 10X-40X)

4.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: thấy hình ảnh trứng giun sán (mẫu phân trong, trứng giun gián không bị trong sẽ thấy rõ trên nền xanh). Đánh giá sơ bộ mức độ nhiễm giun sán dựa vào mật độ của trứng giun sán trong toàn bộ vi trường theo 4 nhóm sau:

+ Từ 1-9 trứng	: +
+ Từ 10-99 trứng	: ++
+ Từ 100-999 trứng	: +++
+ Trên 1000 trứng	: ++++

- Âm tính: không thấy trứng giun sán

4.3. Trả kết quả và lưu hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Cho giấy Cellophan ngâm vào dung dịch nhuộm trên 24 giờ trước khi dùng, không nên nhúng sẵn trước thời gian sử dụng quá lâu.
- Soi lam kính theo hình zíc zắc, tránh bỏ sót vi trường.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

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

19. Xác định M2BPGi miễn dịch tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định sự có mặt và đo lường đồng phân glycosyl hóa của Mac-2 binding protein (M2BPGi) trong huyết thanh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đo lường đồng phân glycosyl hóa của Mac-2 binding protein dựa trên phương pháp xét nghiệm miễn dịch enzyme hóa phát quang với cơ chất hóa phát quang CDP-Star™

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Cồn sát trùng tay nhanh
- Dung dịch khử trùng
- Dung dịch xà phòng rửa tay
- Môi trường vận chuyển mẫu
- Đầu côn 10 µl có lọc
- Đầu côn 30 µl
- Đầu côn 200 µl có lọc
- Đầu côn 1 ml có lọc
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bông tiêm
- Bơm tiêm vô trùng
- Panh
- Giấy thấm không bụi
- Mũ giấy
- Khẩu trang

- Găng khám
- Găng tay không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Hệ thống máy xét nghiệm miễn dịch tự động (VD hoặc hệ thống tương đương)
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20 °C hoặc -70 °C)
- Micropipette
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút âm
- Bồn rửa mắt và tắm khẩn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

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

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: Khoảng 120 phút.

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

Các bước	Nội dung
1	Nhỏ 10 μL mẫu và 50 μL thuốc thử vào cống phản ứng, sau đó ủ 2 phút ở 42°C .
2	Nhỏ 30 μL thuốc thử R2 vào cống phản ứng, ủ trong 1 phút ở 42°C và tách riêng phần hạt từ (cho nam châm tiếp xúc với cống phản ứng, và hút phần chất lỏng).
3	Nhỏ tiếp 100-700 μL dung dịch rửa, sau đó tách riêng phần hạt từ. Lặp lại quy trình này 3 lần.
4	Nhỏ 100 μL thuốc thử R3 vào cống phản ứng, ủ trong 2.5 phút ở 42°C , sau đó tách riêng phần hạt từ (cho nam châm tiếp xúc với cống phản ứng, và hút phần chất lỏng).
5	Nhỏ tiếp 100-700 μL dung dịch rửa, sau đó tách riêng phần hạt từ. Lặp lại quy trình này 3 lần.
6	Nhỏ thêm 50 μL thuốc thử R4 vào trộn đều, cho 100 μL thuốc thử R5 vào trộn đều, ủ trong 5 phút ở 42°C , sau đó đo cường độ ánh sáng.
7	Thiết lập giá trị cut-off: - Nhẹ nhàng trộn M2BPGi NC và M2BPGi PC tránh tạo bọt. Đặt chúng vào vị trí trên máy xét nghiệm theo tài liệu hướng dẫn sử dụng. - Thực hiện quy trình theo “quy trình xét nghiệm chuẩn” và đo cường độ ánh sáng. - Thiết lập giá trị cut-off dựa vào cường độ ánh sáng của M2BPGi PC: Giá trị cut-off = (P) với P là cường độ ánh sáng của M2BPGi PC.

4.2. Nhận định kết quả

Đo mẫu, kiểm soát chất lượng

- Đặt mẫu vào vị trí theo tài liệu hướng dẫn sử dụng máy xét nghiệm.
- Tiến hành theo “quy trình xét nghiệm chuẩn” và đo cường độ ánh sáng.
- Tính toán Chỉ số cut-off (C.O.I.) của mẫu.

* Chỉ số cut-off (C.O.I.) = $(S-N)/(C-N)$

Với: + S là cường độ ánh sáng trong mẫu

+ C là giá trị cut-off

+ N là cường độ ánh sáng trong M2BPGi NC.

* Máy xét nghiệm sẽ tự động thực hiện quy trình này.

- Mẫu được đánh giá như sau:

+ Dương tính (1+) khi cường độ ánh sáng cao hơn giá trị cut-off ($1.00 \leq \text{C.O.I.} < 3.00$);

+ Dương tính (2+) khi cường độ ánh sáng cao hơn giá trị cut-off ($\text{C.O.I.} \geq 3.00$);

+ Âm tính (-) khi cường độ ánh sáng thấp hơn giá trị cut-off ($\text{C.O.I.} < 1.00$).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thu thập mẫu, xử lý và lưu trữ huyết thanh người:

- Nếu phải lưu trữ mẫu, nên cấp đông ở -20°C hoặc thấp hơn. Không lặp lại việc đông và rã đông mẫu bởi có khả năng hình thành hạt nhỏ và cho kết quả không chính xác.
- Mẫu có chứa cục đông Fibrin nên ly tâm ở 2,000xg trong 10 phút để loại bỏ đi những chất không tan.
- Tách huyết thanh không để tán huyết.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

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

20. Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp đa tác nhân (cho ≥ 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định cho từng loại bệnh phẩm) test nhanh

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các tác nhân vi sinh vật gây nhiễm khuẩn hô hấp như vi rút Cúm A, Cúm B, virus hợp bào đường hô hấp RSV, SARS CoV 2... trong bệnh phẩm dịch đường hô hấp.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý bắt cặp đặc hiệu kháng nguyên – kháng thể của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.
- Bệnh phẩm hô hấp được hòa tan vào dung dịch để giải phóng kháng nguyên vi sinh vật. Kháng nguyên vi sinh vật (nếu có) sẽ kết hợp với kháng thể đơn dòng đặc hiệu gắn trên màng nitrocellulose và kết hợp với cộng hợp vàng tạo phức hợp kháng nguyên – kháng thể. Phức hợp hiển thị bằng vạch màu đặc trưng trên vùng tương ứng của dải giấy.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm hóa chất thử nghiệm miễn dịch sắc ký
- Sinh phẩm phát hiện các tác nhân hô hấp bao gồm: Khay thử nghiệm được bảo quản trong túi kín, có gói chất chống ẩm, Dung dịch hòa tan mẫu chứa trong các ống được phân phối với thể tích nhất định và có kèm nắp đậy nhỏ giọt, Mẫu chứng âm, chứng dương
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70% hoặc dung dịch khử trùng khác
- Dung dịch nước rửa tay
- Đầu côn (tip) 10 μ l - 100 μ l
- Giá để ống
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay cao su y tế không bột
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/ kỹ thuật y (3 bộ/ người/ năm)

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

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định tại đơn vị
- Loại mẫu bệnh phẩm: Dịch hô hấp trên
- Tiêu chuẩn :
 - + Dịch rửa ty hầu hoặc tăm bông dịch ty hầu được lấy và bảo quản trong ống vô trùng/ bao gói theo hướng dẫn lấy mẫu bệnh phẩm của từng đơn vị.
 - + Vận chuyển mẫu đến khoa xét nghiệm càng sớm càng tốt và không quá 2 giờ từ thời điểm lấy mẫu.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

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

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Khoa xét nghiệm vi sinh/ phòng xét nghiệm vi sinh.

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

Các bước	Nội dung
1	Mở nắp của ống chứa dung dịch pha loãng mẫu, đặt ống lên giá đựng ống.
2	Nhúng đầu que tăm bông chứa bệnh phẩm vào ống dung dịch pha loãng mẫu, xoay tăm bông vài lần để mẫu được hòa tan trong dung dịch, sau đó lấy tăm bông ra khỏi ống dung dịch. Hoặc sử dụng pipet vô trùng hút một lượng thể tích dịch rửa ty hầu vào ống chứa dung dịch pha loãng mẫu theo tỉ lệ quy định của nhà sản xuất

Các bước	Nội dung
3	Lấy khay thử nghiệm ra khỏi túi bảo quản và ghi thông tin mẫu lên phần quy định của khay thử
4	Đóng nắp ống dung dịch mẫu và nhỏ lượng thể tích vào vị trí quy định cho mẫu trên khay thử theo hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Đọc kết quả xét nghiệm trong khoảng thời gian quy định của nhà sản xuất.
7	Lưu mẫu theo quy trình lưu, hủy mẫu sau xét nghiệm của đơn vị

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Đọc kết quả mẫu chứng

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

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

4.2.2 Đọc kết quả và nhận định kết quả

- Chỉ có vạch xuất hiện tại vị trí C trên khay thử: Không có tác nhân vi sinh vật (tên loại vi sinh vật của khay thử).
- Có vạch xuất hiện tại vị trí C và vạch tại vùng thử có kí hiệu tương ứng với từng loại vi sinh vật T1, T2 hoặc T3 trên khay thử: có tác nhân vi sinh vật (loại vi sinh vật tương ứng vạch trên khay thử).
- Không có vạch phản ứng xuất hiện tại các vị trí C và T của khay thử: xét nghiệm không có giá trị, tiến hành thực hiện lại với khay thử khác.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

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

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

21. Virus/ vi khuẩn nhiễm khuẩn hô hấp khuếch đại nucleic acid (NAAT) đẳng nhiệt

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định định tính virus và vi khuẩn (chẩn đoán in vitro) gây bệnh đường hô hấp bằng công nghệ khuếch đại acid nucleic đẳng nhiệt.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Thiết bị xét nghiệm sinh học phân tử tự động sử dụng công nghệ khuếch đại acid nucleic đẳng nhiệt để phát hiện định tính axit nucleic của virus SARS-CoV-2, virus Cúm A, Cúm B, RSV hoặc Streptococcus nhóm A qua việc sử dụng cartridge riêng biệt. Thay vì sử dụng đun nhiệt, công nghệ này sử dụng enzyme để nhanh chóng thúc đẩy quá trình khuếch đại.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Tăm bông vô trùng/dụng cụ lấy bệnh phẩm
- Môi trường bảo quản bệnh phẩm
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm chức năng:
- Bộ lưu điện
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2 °C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút ẩm
- Bồn rửa mắt và tấm khăn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

* Loại bệnh phẩm:

- Với bệnh phẩm Cúm A&B: Tăm bông lấy dịch mũi/mũi họng
- Với bệnh phẩm RSV: Tăm bông lấy dịch mũi họng
- Với bệnh phẩm Covid-19: Tăm bông lấy dịch mũi/mũi họng
- Với bệnh phẩm Strep A: Tăm bông lấy dịch họng

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

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 120 phút.

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

Đảm bảo các mẫu, thiết bị xét nghiệm ở nhiệt độ phòng.

Kiểm tra xem có thể nhìn thấy viên thuốc thử ở đáy của mỗi ống phản ứng hay không trước khi đưa Test Base vào Thiết bị ID NOW. Không sử dụng Test Base nếu không nhìn thấy viên ở đáy mỗi ống phản ứng.

Bước 1: Bật máy ID Now – bấm nút nguồn ở bên cạnh

Nhập mã người dùng

Chọn “Run Test”

Chọn loại xét nghiệm phù hợp: Cúm A/B, RSV, SAR-CoV-2, Strep A

Chọn loại mẫu (nếu yêu cầu)

Nhập mã bệnh nhân

Bước 2: Mở nắp và đưa Đẻ xét nghiệm vào vị trí. Xác nhận xét nghiệm đúng loại được hiển thị trên màn hình

Bước 3: Đưa bộ nhận mẫu vào vị trí. Đợi làm nóng.

Bước 4: Lấy mẫu và đưa mẫu vào bộ nhận mẫu. Trộn mẫu.

Bước 5: Đưa cartridge chuyển vào bộ nhận mẫu. Sau đó đưa cartridge chuyển vào để xét nghiệm

Bước 6: Đóng nắp thiết bị để bắt đầu thực hiện xét nghiệm. Kết quả sẽ được thực hiện tự động

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu..

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Khi quá trình phản ứng kết thúc, kết quả xét nghiệm sẽ được báo cáo tự động trên màn hình thiết bị (Dương tính/Âm tính hoặc Không hợp lệ).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Nếu thu được kết quả không hợp lệ, cần chạy thêm một xét nghiệm nữa sử dụng cùng một bộ nhận mẫu xét nghiệm. Cần tuân thủ hướng dẫn dưới đây:

- Tháo đế xét nghiệm và hộp chuyển được liên kết khỏi thiết bị và nối phần đế xét nghiệm với một bộ nhận mẫu xét nghiệm mở CHƯA DÙNG. Đế xét nghiệm và hộp chuyển được liên kết PHẢI được gắn vào bộ nhận mẫu xét nghiệm trước khi vứt bỏ. Có thể sử dụng bộ nhận mẫu xét nghiệm từ một gói bộ chuyển mới cho xét nghiệm này.
- Cẩn thận tháo riêng bộ nhận mẫu xét nghiệm màu xanh lam ra khỏi thiết bị. Bộ nhận mẫu xét nghiệm phải được giữ lại và giữ thẳng đứng để tránh làm đổ các chất lỏng.
- Từ màn hình Home, bắt đầu một xét nghiệm mới. Tuân thủ các yêu cầu trên màn hình; tuy nhiên, khi được yêu cầu lắp bộ nhận mẫu xét nghiệm, hãy tái sử dụng bộ nhận mẫu xét nghiệm và KHÔNG dung ly lại que lấy mẫu.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

22. Ký sinh trùng, tế bào soi phân tự động

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm soi phân dùng để tìm phát hiện các thành phần có trong mẫu phân, các thông số phát hiện trên máy xét nghiệm soi phân tự động gồm: Bạch cầu, hồng cầu, tế bào sinh mủ, nấm, hạt mỡ, đại thực bào, bào tử lucidum, hạt tinh bột, tế bào biểu mô, tinh thể charcot-leyden, tinh thể canxi oxalat, máu, trứng sán lá gan nhỏ, trứng giun đũa, trứng giun tóc, trứng sán dây, trứng giun móc, trứng giun kim, ấu trùng giun lươn, blastocystis hominis, trứng sán máng, trứng sán lá gan lớn, trichomonas, amip, cryptosporidium, giardia lamblia.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Mẫu phân sau khi được nạp vào máy sẽ được tự động tiền xử lý (pha loãng, trộn, lọc, làm phong phú mẫu phân và/hoặc nhuộm iod). Mẫu sau khi xử lý được đưa vào buồng đo và soi trên kính hiển vi độ phóng đại 20X và 40X đồng thời camera tích hợp sẵn sẽ tự động chụp các hình ảnh hiển thị các thành phần có trong mẫu phân. kết quả cuối cùng được báo cáo sau khi xem xét thủ công.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Thiết bị y tế:

Ví dụ minh họa cho Máy xét nghiệm soi phân hoàn toàn tự động

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Cốc đựng mẫu
- Dung dịch rửa
- Dung dịch rửa đậm đặc
- Dung dịch pha loãng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám

- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi rác các loại
- Máy xét nghiệm soi phân hoàn toàn tự động (VD hoặc tương đương)
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút âm
- Bồn rửa mắt và tắm khẩn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

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

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

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

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện:

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

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

Các bước	Nội dung
1	Đặt mẫu bệnh phẩm lên khay đựng mẫu của máy.
2	Bộ phận nạp mẫu tự động của máy sẽ chuyển mẫu đến vị trí lấy mẫu đã

Các bước	Nội dung
	được chỉ định. Bơm pít tông và đầu kim dẫn dung dịch phối hợp để pha loãng mẫu và trộn mẫu, kim đâm xuyên qua nắp của cốc đựng mẫu hút một lượng mẫu nhất định cần để xét nghiệm vào buồng đo. Sau khi để lắng mẫu trong buồng đo trong một thời gian nhất định, kính hiển vi phóng đại các thành phần và PC điều khiển camera chụp và lưu hình ảnh của mẫu; báo cáo kết quả sẽ được hình thành dựa theo kết quả xử lý của máy soi tự động.

4.2. Nhận định kết quả

Kết quả báo cáo bao gồm:

- Hình ảnh chụp tính chất vật lý của mẫu kèm theo diễn giải tự động của hệ thống (mẫu phân mềm/lỏng, màu sắc,..)
- Các hình ảnh chụp dưới kính hiển vi và kết quả nhận diện phân tích của hệ thống về các thành phần có trong mẫu phân.
- Xét nghiệm định tính trả kết quả Âm tính/Dương tính.
- Kiểm tra kết quả soi thủ công trong trường hợp cần kiểm tra

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Trong bệnh phẩm phân, có thể nhầm với trứng giun sán khác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định, phiên giải và biện luận kết quả cần cẩn thận và chính xác để tránh nhầm lẫn.
- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả XN.

- PXN tạm dừng trả kết quả cho khách hàng nếu kết quả nội kiểm không đạt. Khi kết quả nội kiểm không đạt, PXN tìm kiếm nguyên nhân và khắc phục, chỉ thực hiện tiếp XN sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

- Chạy QC hàng tháng hoặc khi cần
- Chuẩn bị hóa chất QC và tiến hành chạy mẫu QC dưới chế độ cài đặt chạy QC của máy.
- Thiết bị đã được hiệu chuẩn trước khi xuất xưởng và không yêu cầu hiệu chuẩn thường xuyên, chỉ nên hiệu chuẩn thiết bị trong các trường hợp sau:
 - + Các thành phần hóa chất chính liên quan đến việc xét nghiệm mẫu phân được thay thế.
 - + Khi thiết bị không được sử dụng trong một thời gian dài.
 - + Kết quả kiểm chuẩn có độ lệch rất lớn.
- Yêu cầu thực hiện kiểm tra chất lượng (IQC và/hoặc EQC theo Quyết định 2429/QĐ-BYT)
- Thực hiện chương trình ngoại kiểm (EQA) hoặc so sánh liên phòng.
- Với kết quả xét nghiệm bất thường hoặc nghi ngờ, cần thực hiện lại xét nghiệm hoặc chuyển gửi đến phòng xét nghiệm tham chiếu hoặc các cơ sở y tế có chứng nhận về chất lượng để khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

23. VDRL định tính, định lượng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng thể reagin (kháng thể kháng cardiolipin) trong mẫu huyết thanh hoặc dịch não tủy, hỗ trợ chẩn đoán bệnh giang mai do *Treponema pallidum* gây ra.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

VDRL là một xét nghiệm kết tủa vi thể, được thực hiện dưới dạng định tính và bán định lượng để phát hiện kháng thể reagin trong huyết thanh hoặc dịch não tủy. Kháng nguyên sử dụng là hỗn hợp cardiolipin, cholesterol và lecithin. Khi kháng thể reagin có mặt trong mẫu bệnh phẩm, sẽ cho phản ứng với kháng nguyên VDRL, tạo thành các vi hạt kết tủa có thể quan sát dưới kính hiển vi.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

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

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

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Có thể sử dụng huyết thanh hoặc dịch não tủy.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

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

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

- Để thanh thử và dung môi pha loãng về nhiệt độ phòng.
- Ly tâm mẫu máu 3500 vòng/phút, 10 phút
- Mẫu bệnh phẩm và chứng cần bất hoạt 30min ở 56°C
- 50µL huyết thanh hoặc DNT vào vòng tròn 14mm
- Nhỏ 1 giọt huyền dịch đã pha ở trên
- Đặt lên máy xoay tốc độ 180 ± 5 vòng/phút trong 4 phút cho huyết thanh hoặc 8 phút cho DNT
- Đọc kết quả dưới kính hiển vi độ phóng đại 100 lần

Các bước xét nghiệm bán định lượng

- 50 μ L nước muối vào các vòng tròn 2-4
- 50 μ L huyết thanh hoặc DNT lên vòng tròn 1-2
- Trộn ở vòng 2 bằng pipet 5-6 lần (tránh tạo bọt), chuyển 50 μ L vòng 2 sang 3, trộn 5-6 lần. Lặp lại tương tự ở vòng 4, hút bỏ 50 μ L. Ta có tỷ lệ pha loãng tương ứng từ vòng 1-4 là 1:1; 1:2; 1:4; 1:8
- Thực hiện các bước 2-4 tương tự như xét nghiệm định tính, đọc kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2. Nhận định kết quả

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

4.2.2. Đọc kết quả:

- Xác định hiệu giá kháng thể ở nồng độ pha loãng lớn nhất vẫn còn dương tính.
- Các mẫu huyết thanh dương tính hoặc nghi ngờ hoặc không xác định thì phải làm phản ứng bán định lượng

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- Thực hiện sai quy trình xét nghiệm:
 - + Sử dụng không đúng pipet nhỏ quả hoặc ít hơn lượng bệnh phẩm cần nhỏ
 - + Thời gian đọc kết quả không đúng

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

24. Vi sinh vật nhiễm khuẩn huyết digital PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện được trực tiếp từ máu toàn phần của người các loài vi khuẩn *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus capitis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus hominis* bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng.

Định nghĩa: Droplet Digital PCR: PCR kỹ thuật số vi giọt.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế:

- Bộ sinh phẩm Sepsis Pathogenic Microorganisms Detection Kit (VD hoặc tương đương)
- Sepsis pathogenic microorganisms detection kit (digital PCR)
- Blood Microbiome DNA Isolation Kit
- Sepsis Pathogenic Microorganism Detection Kit
- Cồn tuyệt đối
- Dung dịch khử nhiễm
- Đầu tip có màng lọc, vô trùng 1000 µl
- Grinding tube for Microbiome
- 5ml Tube Strips
- 10-Strip Tip Magnet Rod Sleeve
- Generation Oil for Probes
- Digital PCR cartridge
- Digital PCR cartridge sealing cover
- Heat transfer film
- Khay đựng bệnh phẩm

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm (ống lấy máu EDTA 4 ml)
- Bông tiêm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Khẩu trang
- Găng tay không bột dùng một lần
- Kính bảo vệ mắt
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Túi đựng rách thải sinh học
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Máy DropX-2044HT digital PCR, barcode scanner và hệ thống máy vi tính.
- Hệ thống tách chiết tự động
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ ấm có khả năng đạt tới 65°C
- Tủ lạnh 2°C – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm
- Máy vi tính
- Máy in
- Máy in mã vạch
- Phần mềm quản lý xét nghiệm
- Máy hút âm

- Bồn rửa mắt và tắm khẩn cấp

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

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

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

a. Tách chiết acid nucleic

Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Chuẩn bị PCR mix

- Rã đông kỹ bộ hóa chất ở nhiệt độ phòng.
- Vortex và spin Digital PCR Buffer, hỗn hợp primer, probe Panel A/B/C/D.
- Xác định số lượng phản ứng (N là số lượng phản ứng bao gồm mẫu, đối chứng dương tính và đối chứng âm tính) sẽ được đưa vào thử nghiệm.
- Trong 4 ống, chuẩn bị hỗn hợp Digital PCR bằng cách thêm Digital PCR Buffer và hỗn hợp primer, probe Panel A/B /C/D dựa trên bảng bên dưới. Trộn kỹ hỗn hợp PCR bằng vortex.

Ống	Thành phần	Thể tích (μL)
Panel A	Digital PCR Buffer	10 x (N+1)
	Panel A primer probe mix	2 x (N+1)
	Tổng thể tích (μL)	12 x (N+1)
Panel B	Digital PCR Buffer	10 x (N+1)

Ống	Thành phần	Thể tích (μL)
	Panel B primer probe mix	2 x (N+1)
	Tổng thể tích (μL)	12 x (N+1)
Panel C	Digital PCR Buffer	10 x (N+1)
	Panel C primer probe mix	2 x (N+1)
	Tổng thể tích (μL)	12 x (N+1)
Panel D	Digital PCR Buffer	10 x (N+1)
	Panel D primer probe mix	2 x (N+1)
	Tổng thể tích (μL)	12 x (N+1)

- Rã đông mẫu DNA chiết ở nhiệt độ phòng.
- Chia 12 μL hỗn hợp Digital PCR vào ống 200 μL . Đảm bảo không đưa bất kỳ bọt hoặc bong bóng nào vào ống khi chia hỗn hợp.
- Thêm 8 μL mẫu DNA đã tách chiết (hoặc đối chứng dương tính hoặc đối chứng âm tính) để tạo thành 20 μL hỗn hợp phản ứng PCR kỹ thuật số. Đảm bảo gửi mẫu trực tiếp bằng pipet vào hỗn hợp phản ứng trong ống PCR. Trộn kỹ bằng vortex và ly tâm trong 1 phút.

* Chuẩn bị Microfluidic cartridge

- Đặt microfluidic cartridge vào cartridge holder. Mỗi cartridge holder chứa được 4 cartridge
- Chia 75 μL Generation Oil vào giếng chứa dầu của cartridge. Chia 20 μL Panel A/B/C/D đã chuẩn bị ở bước 2 vào mỗi giếng
- Đặt cartridge lại bằng Cartridge cover, dán Heat film và chuyển vào máy PCR cài chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Đưa vào máy để phân tích kết quả

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm (QC): Chỉ đọc kết quả khi mẫu chứng đạt yêu cầu.

- Đối chứng NC phải báo cáo kết quả âm tính đối với tất cả 15 vi khuẩn gây bệnh được liệt kê (số lượng giọt dương tính ít hơn 3). Nếu bất kỳ Kênh FAM, HEX, ROX hoặc Cy5 nào dương tính thì quá trình chạy Digital PCR không hợp lệ.
- PC và NC được xác định dựa trên mức cutoff <3 positive droplets.
- Kết quả chấp nhận được hiển thị như bảng dưới đây:

Control Type		Negative		Positive	
Control Name		Negative Control (NC)		Positive Control (PC)	
Expected Results and Concentration Values	Bacteroides fragilis	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Staphylococcus epidermidis	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Enterococcus faecium	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Streptococcus pneumoniae	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Acinetobacter baumannii	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Enterobacter cloacae	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Enterococcus faecalis	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Staphylococcus aureus	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Staphylococcus haemolyticus	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Klebsiella pneumoniae	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Pseudomonas aeruginosa	Negative	0-2 positive droplets	Positive	≥ 4 positive droplets

Control Type		Negative		Positive	
Control Name		Negative Control (NC)		Positive Control (PC)	
	Escherichia coli	Positive	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Staphylococcus capitis	Positive	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets
	Stenotrophomonas maltophilia	Positive	0-2 positive droplets	Positive	≥ 5 positive droplets
	Staphylococcus hominis	Positive	0-2 positive droplets	Positive	≥ 3 positive droplets

4.2.2 Đọc và nhận định kết quả

Phân tích kết quả trên phần mềm phân tích

- Tại tab “Plot&Analyses”, chọn “Amplitude 2D”
- Phân tích kết quả trên từng kênh màu
- Transfer data: Chọn tab “Settings” → Export kết quả “Raw data” và “minimize”

Có thể phân tích kết quả dựa trên thông tin phân tích dưới đây:

Bacteria	Positive Droplets	Interpretation
<i>Bacteroides fragilis</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Enterococcus faecium</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0-2 positive droplets	Negative

Bacteria	Positive Droplets	Interpretation
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Enterobacter cloacae</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Enterococcus faecalis</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Staphylococcus aureus</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0-3 positive droplets	Negative
	≥ 4 positive droplets	Positive
<i>Escherichia coli</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Staphylococcus capitis</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0-4 positive droplets	Negative
	≥ 5 positive droplets	Positive
<i>Staphylococcus hominis</i>	0-2 positive droplets	Negative
	≥ 3 positive droplets	Positive

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Số lượng bản sao của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Số lượng bản sao của mẫu ít: lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện các bản sao:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Số lượng bản sao của chứng dương ít hoặc không có: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.2.5. Tín hiệu phân bố không đồng đều trên plate: lặp lại phản ứng

- Thao tác pipet chính xác để không tạo bọt khi chia hóa chất vào các giếng trên plate.
- Kiểm tra không gian xung quanh vị trí đặt máy Rainsure (nên đặt máy trên 1 bàn độc lập, không có các thiết bị khác gây ảnh hưởng).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

25. Vi khuẩn miễn dịch huỳnh quang

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch để phát hiện định tính kháng nguyên vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm dựa trên công nghệ miễn dịch huỳnh quang để phát hiện kháng nguyên vi khuẩn. Thẻ xét nghiệm có vạch chứng và vạch thử được phủ trước với kháng thể đơn dòng kháng PPR và kháng thể thử kháng vi khuẩn tương ứng. Mẫu bệnh nhân được đưa vào giếng nhỏ mẫu trên thẻ xét nghiệm và mẫu di chuyển dọc theo màng. Nếu có kháng nguyên vi khuẩn, nó sẽ tương tác với europium liên hợp với kháng thể đơn dòng kháng vi khuẩn tại lớp đệm liên hợp và hình thành phức hợp hạt huỳnh quang kháng thể- kháng nguyên. Phức hợp này di chuyển dọc theo màng đến vạch thử và bị bắt giữ bởi kháng thể kháng vi khuẩn trên vạch thử và hình thành tín hiệu huỳnh quang. Cường độ của ánh sáng huỳnh quang tạo thành trên màng được quét bởi máy xét nghiệm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

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

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

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Có thể sử dụng huyết thanh, tẩm bông hoặc dịch sinh học của người. Mẫu bệnh phẩm được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

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

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

Chuẩn bị mẫu

- Để các thành phần của kit và mẫu xét nghiệm đến nhiệt độ phòng (15-30°C (59-86°F) trong tối thiểu 30 phút trước khi tiến hành xét nghiệm.
- Đọc kỹ Hướng dẫn sử dụng kit xét nghiệm
- Kiểm tra hạn dùng ở mặt sau túi nhôm. Sử dụng lô thành phẩm khác nếu đã quá

hạn dùng.

- Mở túi nhôm, kiểm tra thẻ xét nghiệm và gói hút ẩm silicagel trong túi.

Chuẩn bị mẫu chứng dương/chứng âm

- Đặt tấm bông chứng dương/ chứng âm có trong bộ kit vào ống dung dịch đệm để chiết tách chứng. Xoay tấm bông ít nhất năm lần.
- Lấy tấm bông ra và loại bỏ tấm bông đã sử dụng tuân thủ theo quy định xử lý chất thải nguy hiểm sinh học.
- Để phân tích mẫu chứng, thực hiện theo hướng dẫn về 'Phân tích mẫu'

Phân tích mẫu xét nghiệm

- Sử dụng chế độ Xét nghiệm chuẩn “STANDARD TEST”:
- Sử dụng các máy phân tích : Chọn chế độ xét nghiệm chuẩn “Standard Test” -> Nhập ID bệnh nhân và/hoặc ID người vận hành lên máy phân tích.
 - + Lấy thẻ xét nghiệm ra khỏi túi nhôm và đặt lên một bề mặt khô và phẳng. Viết thông tin bệnh nhân lên nhãn của thẻ xét nghiệm.
 - + Cài thẻ xét nghiệm vào khe thẻ của máy phân tích.
 - + Bóp bầu trên cùng của pipet thể tích cố định (100µl) và đặt đầu pipet vào mẫu đã chuẩn bị.
 - + Thả chậm bầu trên cùng của pipet thể tích cố định sao cho đầu pipet luôn nhúng trong mẫu đã chuẩn bị.
 - + Nhỏ hoàn toàn lượng mẫu trong pipet vào giếng nhỏ mẫu trên thẻ xét nghiệm bằng cách bóp mạnh bầu trên cùng của pipet.
 - + Sau khi nhỏ mẫu xét nghiệm, ngay lập tức nhấn “TEST START”.
 - + Máy phân tích sẽ tự động hiển thị kết quả xét nghiệm trong vòng 15 phút. Mẫu dương tính mạnh có thể được phát hiện sớm trong 5 phút trên máy phân tích.
- Sử dụng chế độ Chỉ đọc “READ ONLY”
 - + Lấy thẻ xét nghiệm ra khỏi túi nhôm và đặt lên bề mặt phẳng và khô. Viết thông tin của mẫu xét nghiệm lên trên nhãn của thẻ xét nghiệm
 - + Bóp bầu trên cùng của pipet thể tích cố định (100µl) và đặt đầu pipet vào mẫu đã chuẩn bị
 - + Thả chậm bầu trên cùng của pipet thể tích cố định sao cho đầu pipet luôn nhúng trong mẫu đã chuẩn bị.
 - + Nhỏ hoàn toàn lượng mẫu trong pipet vào giếng mẫu trên thẻ xét nghiệm bằng cách bóp mạnh bầu trên cùng của pipet.
 - + Ủ thẻ xét nghiệm trong 15 phút ở bên ngoài máy phân tích. Không được ủ quá 20 phút
 - + Chuẩn bị máy phân tích và đặt chế độ chỉ đọc “READ ONLY” theo hướng dẫn sử dụng của máy phân tích
 - + Cài thẻ xét nghiệm vào khe thẻ của máy.

- + Khi cài thẻ xét nghiệm vào máy phân tích, nó sẽ tự động quét và hiển thị kết quả xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm: Vùng kiểm soát quy trình nội kiểm nằm trên màng của thẻ xét nghiệm (vùng chứng). Các máy phân tích đọc tín hiệu huỳnh quang của vùng kiểm soát quy trình nội kiểm. Chỉ trả kết quả khi kết quả nội kiểm hợp lệ.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: $COI < 1,0$
- Dương tính: $COI \geq 1,0$
- Không hợp lệ: Không có giá trị ngưỡng
- Khi kết quả không hợp lệ → thực hiện lại xét nghiệm. với mẫu bệnh phẩm mới

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- + Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- + Sử dụng dung dịch đệm của lô khác, sử dụng lại kit xét nghiệm
- + Thẻ xét nghiệm không sử dụng ngay sau khi lấy ra khỏi túi nhôm.
- + Quét lại trên cùng một thiết bị sau khi thẻ xét nghiệm đã được máy phân tích quét thành công,
- + Phát hiện là một hợp chất huỳnh quang, không tạo ra kết quả nhìn thấy bằng mắt thường trên thẻ xét nghiệm.
- + Viết lên mã vạch hoặc làm hỏng mã vạch của thẻ xét nghiệm.
- + Sử dụng các mẫu không được chỉ định trong hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

26. Virus miễn dịch huỳnh quang

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm miễn dịch để phát hiện định tính kháng nguyên hoặc kháng thể của virus trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm dựa trên công nghệ miễn dịch huỳnh quang trên máy phân tích để phát hiện kháng nguyên virus. Mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân được đưa vào ống đệm chiết chứa dung dịch đệm chiết để chiết tách kháng nguyên vi rút. Mẫu đã chiết được đưa vào giếng mẫu trên thẻ xét nghiệm và mẫu thử di chuyển dọc theo màng từ giếng mẫu. Nếu có kháng nguyên virus trong mẫu, nó sẽ liên kết với kháng thể kháng virus liên hợp với vi hạt europium sau đó di chuyển qua màng. Các vi hạt huỳnh quang chứa kháng nguyên virus sẽ được bắt giữ bởi kháng thể đơn dòng kháng virus trên vạch thử. Cường độ của ánh sáng phát quang được tạo ra trên màng được quét bởi máy phân tích.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

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

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

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Có thể sử dụng huyết thanh hoặc các dịch sinh học của người. Mẫu bệnh phẩm được lấy vào lọ đựng mẫu sạch, đóng kín
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

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

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

Chuẩn bị mẫu

- Để các thành phần của kit và mẫu xét nghiệm đến nhiệt độ phòng (15-30°C (59-86°F) trong tối thiểu 30 phút trước khi tiến hành xét nghiệm.
- Đọc kỹ Hướng dẫn sử dụng kit xét nghiệm
- Kiểm tra hạn dùng ở mặt sau túi nhôm. Sử dụng lô thành phẩm khác nếu đã quá hạn dùng.

- Mở túi nhôm, kiểm tra thẻ xét nghiệm và gói hút ẩm silicagel trong túi.

Chuẩn bị mẫu chứng dương/chứng âm

- Đặt tấm bông chứng dương/ chứng âm có trong bộ kit vào ống dung dịch đệm để chiết tách chứng. Xoay tấm bông ít nhất năm lần.
- Lấy tấm bông ra và loại bỏ tấm bông đã sử dụng tuân thủ theo quy định xử lý chất thải nguy hiểm sinh học.
- Để phân tích mẫu chứng, thực hiện theo hướng dẫn về 'Phân tích mẫu'

Xử lý mẫu bệnh phẩm

- Mẫu tấm bông ngoáy dịch mũi họng: Xử lý như đối với mẫu chứng.
- Mẫu dịch hút/Dịch rửa mũi họng hoặc các mẫu xét nghiệm trong môi trường vận chuyển:
 - + Bóp vào bóng trên của ống nhỏ giọt thể tích cố định (300μl) và đưa đầu ống vào trong mẫu đã thu thập.
 - + Từ từ thả bóng trên của ống nhỏ giọt ra để ống hút đầy ống nhỏ giọt thể tích cố định
 - + Bóp mạnh bóng trên của ống nhỏ giọt thể tích cố định vào ống đệm chiết để giải phóng toàn bộ mẫu
 - + Trộn đều mẫu xét nghiệm với dung dịch đệm chiết tách bằng cách bóp và thả bóng trên vài lần thật cẩn thận
 - + Loại bỏ ống nhỏ giọt và đậy chặt nắp lọ vào ống dung dịch đệm

Phân tích mẫu xét nghiệm

- Sử dụng chế độ Xét nghiệm chuẩn “STANDARD TEST”: Sử dụng các máy phân tích: Chọn chế độ xét nghiệm chuẩn “Standard Test” -> Nhập ID bệnh nhân và/hoặc ID người vận hành lên máy phân tích.
 - + Lấy thẻ xét nghiệm ra khỏi túi nhôm và đặt lên một bề mặt khô và phẳng. Viết thông tin bệnh nhân lên nhãn của thẻ xét nghiệm.
 - + Cài thẻ xét nghiệm vào khe thẻ của máy phân tích.
 - + Nhỏ 4 giọt hỗn hợp mẫu vào giếng mẫu của thẻ xét nghiệm
 - + Sau khi nhỏ mẫu xét nghiệm, ngay lập tức nhấn “TEST START”.
 - + Máy phân tích sẽ tự động hiển thị kết quả xét nghiệm trong vòng 15 phút. Mẫu dương tính mạnh có thể được phát hiện sớm trong 5 phút trên máy phân tích.
- Sử dụng chế độ Chỉ đọc “READ ONLY”
 - + Lấy thẻ xét nghiệm ra khỏi túi nhôm và đặt lên bề mặt phẳng và khô. Viết thông tin của mẫu xét nghiệm lên trên nhãn của thẻ xét nghiệm.
 - + Nhỏ 4 giọt hỗn hợp mẫu vào giếng mẫu của thẻ xét nghiệm.
 - + Ủ thẻ xét nghiệm trong 15 phút ở bên ngoài máy phân tích. Không được ủ quá 20 phút.

- + Chuẩn bị máy phân tích và đặt chế độ chỉ đọc “READ ONLY” theo hướng dẫn sử dụng của máy phân tích.
- + Cài thẻ xét nghiệm vào khe thẻ của máy.
- + Khi cài thẻ xét nghiệm vào máy phân tích, nó sẽ tự động quét và hiển thị kết quả xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm: Vùng kiểm soát quy trình nội kiểm nằm trên màng của thẻ xét nghiệm (vùng chứng). Các máy phân tích đọc tín hiệu huỳnh quang của vùng kiểm soát quy trình nội kiểm. Chỉ trả kết quả khi kết quả nội kiểm hợp lệ.

4.2.2. Đọc kết quả:

- Âm tính: $COI < 1,0$
- Dương tính: $COI \geq 1,0$
- Không hợp lệ: Không có giá trị ngưỡng
- Khi kết quả không hợp lệ → thực hiện lại xét nghiệm. với mẫu bệnh phẩm mới

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể gặp khi:

- + Hóa chất bị hư hỏng, hết hạn. Tiến hành làm lại xét nghiệm với hóa chất mới đảm bảo chất lượng.
- + Sử dụng dung dịch đệm của lô khác, sử dụng lại kit xét nghiệm
- + Thẻ xét nghiệm không sử dụng ngay sau khi lấy ra khỏi túi nhôm.
- + Quét lại trên cùng một thiết bị sau khi thẻ xét nghiệm đã được máy phân tích quét thành công,
- + Chất phát hiện là một hợp chất huỳnh quang, không tạo ra kết quả nhìn thấy bằng mắt thường trên thẻ xét nghiệm.
- + Viết lên mã vạch hoặc làm hỏng mã vạch của thẻ xét nghiệm.

- + Sử dụng các mẫu không được chỉ định trong hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

27. Vi nấm miễn dịch huỳnh quang

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện kháng nguyên *Aspergillus galactomannan* trong huyết thanh người và dịch rửa phế nang (BAL) giúp hỗ trợ chẩn đoán bệnh Aspergillosis xâm lấn. Kết quả được đọc trên máy phân tích huỳnh quang.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm dòng chảy bên TECO® Fast Aspergillus Galactomannan Ag sử dụng phương pháp sắc ký miễn dịch huỳnh quang kẹp kháng thể kép để phát hiện *Aspergillus galactomannan* trong mẫu huyết thanh người và mẫu BAL.

Kháng nguyên *Aspergillus galactomannan* (nếu có) sẽ kết hợp sẽ kết hợp với phức hợp vi cầu huỳnh quang và di chuyển xa hơn dọc theo màng nitrocellulose. Kháng thể anti-Galactomannan phủ trên vạch thử nghiệm (T) tương tác với các phức hợp trên kháng thể hiển thị các dải huỳnh quang trên vạch kiểm soát chất lượng (C) kết hợp với kháng thể IgY kháng gà của dê. Vạch (C) phải luôn hiển thị một dải huỳnh quang để kiểm tra xem thử nghiệm có hoạt động chính xác hay không cũng như một tiêu chuẩn kiểm soát nội bộ. Đọc vùng phát hiện bằng máy phân tích miễn dịch huỳnh quang để có tín hiệu huỳnh quang, diễn giải giá trị chỉ số.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

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

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

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, dịch rửa phế nang (BAL)
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

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

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

a. Chuẩn bị mẫu

- Thêm 300 µL huyết thanh/BAL vào ống phản ứng 1,5 ml.
- Thêm 100 µL dung dịch xử lý mẫu vào ống chứa huyết thanh/BAL.
- Lắc xoáy trong 10 giây để trộn đều, quay ly tâm trong 5 giây ở tốc độ 10.000×g

- Làm nóng ống ở 110°C (máy ủ nhiệt khô) hoặc ở 100°C (bể ủ nhiệt ướt) trong 3-4 phút.
- Ly tâm ống ở tốc độ $10.000 \times g$ trong 10 phút. (Khuyến nghị 4°C nếu máy ly tâm được làm lạnh).
- Thu thập phần nổi và sử dụng để thử nghiệm. Phần nổi có thể được thu thập và bảo quản ở 2-8°C trong tối đa 8 giờ trước khi thử nghiệm. Nếu phân tích kết quả cho thấy cần phải thử nghiệm lại, phải xử lý một phần mẫu khác để thử nghiệm.
- Lưu ý: các mẫu đối chứng không cần xử lý.

b. Quy trình LFA

- Tham khảo kỹ hướng dẫn sử dụng trước khi thực hiện xét nghiệm.
- Trước khi xét nghiệm, đảm bảo rằng các thanh thử và mẫu bệnh phẩm ở nhiệt độ phòng. Sử dụng thanh thử trong vòng 30 phút sau khi mở túi
- Đặt thanh thử trên một mặt phẳng và sạch; từ từ phân phối 100 µL dịch mẫu hoặc dung dịch đối chứng chưa xử lý vào miếng đệm mẫu.
- Đảm bảo mã QR cụ thể cho từng lô đã được tải lên máy đọc và được kích hoạt, đồng thời chọn loại mẫu chính xác (huyết thanh hoặc BAL, đối chứng được xử lý như mẫu huyết thanh).
- Đọc và ghi lại kết quả chỉ số bằng máy phân tích miễn dịch huỳnh quang sau 20 phút (Không quá 25 phút, vì có thể xảy ra kết quả bất thường).

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1 Xem xét kết quả nội kiểm: Máy phân tích miễn dịch huỳnh quang sẽ tự động tính toán tín hiệu của Đường kiểm soát (C). Nếu không thành công, máy sẽ hiển thị “Không hợp lệ”. Cần phải lặp lại xét nghiệm.

- Khuyến nghị là ít nhất một phép đo kiểm soát cho mỗi bộ dụng cụ hoặc ít nhất một lần chạy kiểm soát mỗi tháng.

4.2.2 Đọc kết quả:

- Chỉ số $\geq 0,5$ được coi là dương tính với kháng nguyên galactomannan.

Lưu ý: Đối với tất cả các bệnh nhân dương tính, nên lặp lại xét nghiệm với một mẫu mới (huyết thanh/BAL).

- Chỉ số $< 0,5$ được coi là âm tính với kháng nguyên galactomannan.

Lưu ý: Kết quả âm tính có thể chỉ ra rằng kết quả của bệnh nhân thấp hơn mức có thể phát hiện được của xét nghiệm. Kết quả âm tính không loại trừ chẩn đoán Bệnh Aspergillosis xâm lấn. Nên xét nghiệm lại nếu kết quả âm tính nhưng nghi ngờ mắc bệnh.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Các điều kiện sau đây có thể gây ra kết quả dương tính giả:

- a. Sử dụng kháng sinh β -lactam: chẳng hạn như piperacillin / tazobactam, amoxicillin / axit clavulanic, cefepime, cefoperazone / sulbactam, v.v.
- b. Phản ứng chéo với các loại nấm khác: chẳng hạn như histoplasma, fusarium và penicillium.
- c. Truyền các sản phẩm máu như albumin, immunoglobulin và các yếu tố đông máu.
- d. Vi hệ bình thường bifidobacterium ở trẻ sơ sinh: Sự hiện diện của nồng độ bifidobacteria cao trong ruột của trẻ sơ sinh và trẻ em dẫn đến xét nghiệm galactomannan huyết thanh dương tính ở trẻ sơ sinh.
- e. Ngũ cốc: Galactomannans có trong một số loại ngũ cốc và đi vào máu qua niêm mạc ruột bị tổn thương.
- f. Các yếu tố khác: Sự hiện diện của các quyết định kháng nguyên phản ứng chéo với galactomannans trong tã bông được sử dụng trong quá trình phẫu thuật.

5.2.2. Các tình trạng sau đây có thể gây ra kết quả âm tính giả:

- a. Điều trị dự phòng chống nấm mốc sẽ ảnh hưởng đáng kể đến kết quả xét nghiệm galactomannans.
- b. Nhiễm trùng tại chỗ, bao gồm u hạt mạn tính.
- c. Ở một số bệnh nhân bị nhiễm aspergillus, galactomannans có thể bị phân hủy hoặc trung hòa bởi kháng thể để gây ra kết quả âm tính giả.

Kết quả xét nghiệm đối với cùng một bệnh nhân có thể khác nhau ở các giai đoạn khác nhau của bệnh, trong các điều kiện sinh lý khác nhau và trong các loại thuốc khác.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

28. Dengue-Chikungunia-Zika virus Real-time PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định RNA đặc trưng của các virus Dengue-Chikungunia-Zika trong mẫu bệnh phẩm của người bằng kỹ thuật Real-time PCR đa tác nhân.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Xác định vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm dựa trên công nghệ phát hiện đa đích và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 µL- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 µL- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml

- Panh Cái
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2oC – 8oC
- Tủ lạnh âm sâu -20oC
- Tủ lạnh âm sâu -70oC
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl
- Bàn xét nghiệm

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu toàn phần, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, mẫu mô và các dịch sinh học khác. Tốt nhất là huyết thanh và nước tiểu.
- Đảm bảo tiêu chuẩn nhận mẫu và xử lý mẫu theo quy định.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 300 phút (5 giờ).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

- Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết RNA nếu cần.

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

a. Tách chiết acid nucleic

- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy Real-time PCR.

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Bóc lớp vỏ nhôm che phủ trên đĩa hoặc tube phản ứng.
- Cho dung dịch hồi chỉnh vào mỗi giếng.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch RNA tách chiết vào từng giếng, đầy nắp, ly tâm nhẹ. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Bật máy real-time PCR. Bật máy tính khởi động chương trình real-time PCR trước khi chạy mẫu ít nhất 15 phút.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu Cy5 (Zika), FAM (Dengue), ROX (Chikungunya) cho mẫu, chứng dương và chứng âm và HEX (hoặc JOE/VIC) cho chứng nội.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

Chú ý: Đối với các tác nhân có cùng chương trình PCR thì có thể thực hiện chung 1 lần. Nếu màu dùng để phát hiện các tác nhân là khác nhau thì cứ mỗi tác nhân sẽ chọn màu tương ứng cho nó.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

4.2.2. Đọc kết quả

Diễn giải kết quả theo quy trình của phòng xét nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

5.2.1. Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

- Phản ứng PCR bị ức chế: $\Rightarrow$ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử $\Rightarrow$ Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

5.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại xét nghiệm.

5.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

- Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ:
 $\Rightarrow$ Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 $\Rightarrow$ Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 $\Rightarrow$ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 $\Rightarrow$ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

5.2.4. Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.

- Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

- Chứng dương bị hỏng $\Rightarrow$ Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn $\Rightarrow$ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

29. Beta - D glucan định lượng

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm (1-3)- β -D-Glucan nấm được thực hiện bằng phương pháp quang phổ để phát hiện định lượng (1-3)- β -D-Glucan trong huyết thanh người bằng kỹ thuật ELISA. Đây là một tham chiếu chẩn đoán cho các bệnh nấm xâm nhập.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý: Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch hấp phụ gắn enzym). Huyết thanh đã qua xử lý được thêm vào thuốc thử chính, chứa yếu tố G. Yếu tố G được kích hoạt bởi (1-3)- β -D-Glucan và yếu tố G đã kích hoạt chuyển enzyme tiền đông máu thành enzyme đông máu. Enzyme đông máu thủy phân cơ chất (Boc-leu-Gly-Arg-PNA) để giải phóng PNA. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 405 nm theo phương pháp động học.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

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

2.2. Thiết bị y tế

- Bộ sinh phẩm chẩn đoán nấm (1-3)- β -D-Glucan
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Đầu côn (típ) 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Bơm kim tiêm vô trùng
- Panh

- Kính lọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sĩ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Máy ly tâm thường
- Dàn máy ELISA và máy tính có cài đặt phần mềm
- Hệ thống quản lý phòng xét nghiệm
- Bộ lưu điện.
- Máy lắc trộn Vortex
- Tủ lạnh 2oC – 8oC
- Tủ lạnh âm sâu -20 oC
- Tủ lạnh âm sâu -70 oC
- Bộ pipette các kích cỡ từ 10 µl đến 1000 µl

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

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

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 240 phút (4 giờ).

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

3. AN TOÀN

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

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

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

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

Các bước	Nội dung
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng với nước cất theo tỷ lệ hướng dẫn của nhà sản xuất, chuẩn bị dung dịch đệm mẫu, cộng hợp, dung dịch hiện màu....
4	Khởi động hệ thống: Bật máy lên và khởi động hệ thống bằng cách nhấp đúp vào biểu tượng chương trình.
5	Kiểm tra nước cất, nước rửa, đầu tip...
6	- Kiểm tra hệ thống: Hệ thống được khởi động và kiểm tra chức năng máy. - Đưa sinh phẩm và mẫu bệnh phẩm vào máy: + Đưa sinh phẩm có mã vạch vào máy. + Đưa mẫu bệnh phẩm vào: khay đựng mẫu cuối cùng được đưa vào trước + Nhập mã số hoặc tên bệnh nhân vào bảng mẫu và chọn test sử dụng. + Tiếp tục cho các khay đựng mẫu bệnh nhân tiếp theo.
7	Nhập thông tin bệnh nhân: Nhập thủ công: Chọn Utilities -> Patient Details và xác định bệnh nhân và thử nghiệm Beta-D glucan trong Patient Editor. Chọn Add Patient(s) để mở hộp thoại kế tiếp. Nhập mã số bệnh nhân và số lượng bệnh nhân vào ô Number of Patients. Chọn Add Test(s) trong hộp thoại Patient Editor. Xác định bệnh nhân với thử nghiệm Beta-D glucan bằng cách chọn bệnh nhân sau đó chọn loại thử nghiệm. Nhập bệnh nhân có mã vạch: Nhấn File -> New -> Worklist Plate, Assay và test đã hiện lên sẵn chỉ cần kiểm tra lại và nhấn OK Nhấn Start Thuốc thử và mẫu bệnh nhân đã được tự động được đưa vào vị trí. Kiểm tra vị trí bình nước rửa, đầu tip.

Các bước	Nội dung
	Nhấn OK Nhập Lot, hạn sử dụng và mã: NC, CAL, PC nhấn OK Đặt Plate vào vị trí qui định theo hướng dẫn của máy và đặt tên cho Plate đó.
8	Chương trình bắt đầu chạy test đặt sẵn theo quy trình: - Phân bổ các giếng trên Microtiter plate R8 cho các mẫu chuẩn, đối chứng và mẫu. - Hút 60 μl Dung dịch Diluent R6 vào các giếng tương ứng làm đối chứng âm tính. - Hút 60 μl dung dịch Chuẩn (A, B, C, D và E) vào các giếng tương ứng. - Hút 20 μl mẫu huyết thanh hoặc đối chứng dương tính vào các giếng tương ứng. - Thêm 40 μl Dung dịch Solution R3 vào các giếng chứa 20 μl mẫu huyết thanh hoặc đối chứng dương tính. - Lắc trong 5–10 giây và ủ đĩa Microtiter ở 37°C trong 10 phút. - Thêm 100 μl Main Reagent R1 mới hoàn nguyên vào mỗi giếng. - Lắc đĩa trong 5–10 giây. - Đọc giá trị OD ở 37°C theo phương pháp động học tại 405 nm và 490 nm trong 40 phút.
9	Khi đã kết thúc quá trình thử nghiệm, kết quả được lưu lại vào một tập tin và hiển thị lên màn hình.
10	Lấy sinh phẩm, mẫu bệnh phẩm và tắm ra sau khi chạy máy xong.
11	Vệ sinh máy: Cất nước rửa và thay bằng nước cất. Đổ đầu tip đã sử dụng và bình đựng nước thải. Súc rửa bình nước thải
12	Tắt máy tính.
13	Tắt máy miễn dịch.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Kết quả được chấp nhận khi kết quả của mẫu chứng đạt các yêu cầu:

- Xem xét kết quả QC:

- + *Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất*: Chạy kiểm tra chứng âm và chứng dương mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- + *Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm*
 - NC và PC: Đánh giá kết quả theo hướng dẫn theo dõi QC
 - Quy trình xét nghiệm được thực hiện xem xét định kỳ hàng năm: xem xét độ lặp lại, độ tái lập...

4.2.2. Đọc và nhận định kết quả

Lập đồ thị Đường chuẩn: Lập một đường cong hiệu chuẩn bằng cách vẽ nồng độ tiêu chuẩn trên trục x và độ đục trung bình OD/phút trên trục y. Sử dụng đường khớp hồi quy tuyến tính để xử lý dữ liệu. Nồng độ (1-3)- β -D-Glucan của mẫu và đối chứng có thể được đọc từ đường cong tiêu chuẩn này.

Kết quả điển hình: Độ đục trung bình OD/phút của đối chứng âm phải nhỏ hơn Standard E, cho thấy xét nghiệm không bị nhiễm bẩn. Nếu có sự lệch lớn trong đường cong tiêu chuẩn, nên lập lại xét nghiệm. Hệ số tương quan r^2 phải $> 0,980$. Nồng độ tính toán của đối chứng dương phải nằm trong phạm vi mục tiêu được chỉ định trên nhãn của lọ Control **R5** cho từng lô cụ thể. Nếu giá trị của đối chứng dương không nằm trong giới hạn của phạm vi mục tiêu, kết quả xét nghiệm nên được coi là không đáng tin cậy và mẫu cần được xét nghiệm lại.

Giải thích kết quả: Các giới hạn cắt được xác định trong quần thể được nghiên cứu để thu thập các đặc tính hiệu suất. Tuy nhiên, mỗi phòng thí nghiệm có thể muốn thiết lập các giá trị cắt và giải thích kết quả âm tính và dương tính riêng với quần thể bệnh nhân của họ.

- Kết quả < 70 pg/ml cho thấy kết quả âm tính.
- Kết quả ≥ 95 pg/ml cho thấy kết quả dương tính.
- Kết quả $70 \text{ pg/ml} \leq \text{Kết quả} < 95 \text{ pg/ml}$ cho thấy kết quả không kết luận. Kết quả không kết luận cho thấy nghi ngờ nhiễm nấm xâm lấn, cần lấy mẫu bổ sung và xét nghiệm lại

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

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

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

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

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thông thường do: thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn, nhiễm chéo mẫu bệnh phẩm: Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao. Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...), dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản

Xử trí:

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

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật:

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

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

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