

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 Dự ứng - Miễn dịch lâm sàng - 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 18/10/2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành danh mục kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh;

Căn cứ Biên bản họp ngày 21/3/2024 của Hội đồng chuyên môn nghiệm thu quy trình kỹ thuật về Dự ứng - Miễn dịch lâm sàng; Biên bản họp ngày 15/7/2025 về xây dựng định mức kinh tế - kỹ thuật dịch vụ khám bệnh, chữa bệnh về Dự ứng - Miễn dịch lâm sàng và công văn số 4698/BM-KHTH ngày 21/7/2025 của Bệnh viện Bạch Mai gửi Cục QLKCB dự thảo quy trình kỹ thuật về Dự ứng - Miễn dịch lâm sàng 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 Dự ứng - Miễn dịch lâm sàng - Tập 2”, gồm 24 quy trình kỹ thuật.

Điều 2. Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Dự ứng - Miễn dịch lâm sàng - 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;
- Tổng hội Y học Việt Nam và các hội y khoa;
- Lưu: VT, KCB.

KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG

Trần Văn Thuấn

phongcd.kcb_Cao Duc Phuong_22/08/2025 16:16:27



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ DỊCH-ỨNG-MIỄN DỊCH LÂM SÀNG-TẬP 2

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

Hà Nội, 2025

DANH SÁCH BAN SOẠN THẢO

Chỉ đạo biên soạn, thẩm định

GS.TS. Trần Văn Thuần	Thứ trưởng Bộ Y tế
TS. Hà Anh Đức	Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh (QLKCB)

Chủ biên

TS. Nguyễn Hoàng Phương	Giám đốc Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng Bệnh viện Bạch Mai, Phó trưởng Bộ môn Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Trường Đại học Y Hà Nội, Chủ tịch Hội Hen, Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng Việt Nam
TS. Vương Ánh Dương	Phó Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh

Tham gia biên soạn, thẩm định

TS. Phạm Huy Thông	Phó Giám đốc Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai, Tổng Thư ký Hội Hen, Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng Việt Nam
TS. Nguyễn Hữu Trường	Trung tâm Dị ứng Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai
BS. Chu Chí Hiếu	Trung tâm Dị ứng Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai
KS. Phan Ngọc Bích	Kỹ thuật viên trưởng Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai
TS. Nguyễn Lan Anh	Giám đốc trung tâm Da liễu – Dị ứng, Chủ nhiệm khoa Dị ứng, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
TS. Bùi Văn Dân	Trưởng khoa Da liễu - Dị ứng Bệnh viện E
TS. Nguyễn Văn Đĩnh	Trưởng khoa Nội chung, Trưởng Đơn vị Dị ứng, Bệnh viện Vinmec Times City
PGS.TS. Phan Quang Đoàn	Nguyên trưởng Bộ môn Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Trường Đại học Y Hà Nội
PGS.TS. Nguyễn Văn Đoàn	Nguyên Giám đốc Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng Bệnh viện Bạch Mai, nguyên trưởng Bộ môn Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Trường Đại học Y Hà Nội
ThS. Nguyễn Thị Thanh Hà	Trưởng phòng Chế độ bảo hiểm y tế, Ban Thực hiện chính sách bảo hiểm y tế, Bảo hiểm xã hội Việt Nam
PGS.TS. Trần Thúy Hạnh	Nguyên Giám đốc Bệnh viện Bạch Mai, Phó Chủ tịch Hội Hen, Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng Việt Nam
ThS. Vũ Thị Hằng	Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai
PGS.TS. Trịnh Mạnh Hùng	Nguyên Phó trưởng khoa Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai, nguyên Trưởng khoa Dị ứng - Hô hấp, Bệnh viện Hữu Nghị
TS. Bùi Văn Khánh	Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai
PGS.TS. Hoàng Thị Lâm	Bệnh viện Tâm Anh thành phố Hồ Chí Minh
PGS.TS. Đặng Hùng Minh	Phó Trưởng khoa Khám bệnh, Bệnh viện Bạch Mai

ThS. Trương Lê Vân Ngọc	Trưởng phòng Nghiệp vụ, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
ThS. Nguyễn Như Nguyệt	Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai
TS. Trương Thái Phương	Trưởng khoa Vi sinh, Bệnh viện Bạch Mai
BSCKII. Trần Thái Sơn	Trưởng khoa Da Liễu, Bệnh viện Bạch Mai
PGS.TS. Lê Đình Tùng	Phó Hiệu trưởng Trường Đại học Y Hà Nội, Phụ trách Bộ môn Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Trường Đại học Y Hà Nội
PGS.TS. Vũ Thị Minh Thục	Nguyên Trưởng khoa Dị ứng, Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương
GS.TS. Phạm Văn Thúc	Nguyên Hiệu trưởng Đại học Y Dược Hải Phòng, Chủ tịch Hội Miễn dịch trị liệu ung thư Việt Nam
PGS.TS. Nguyễn Thị Vân	Nguyên Giảng viên cao cấp bộ môn Dị ứng miễn dịch lâm sàng, Trường Đại học Y Hà Nội Hà Nội
Thư ký	
KS. Phan Ngọc Bích	Kỹ thuật viên trưởng Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai
CN. Vũ Thị Dung	Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai
CN. Nguyễn Thị Hoa	Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai
BSCKI. Đoàn Quang Hiệt	Chuyên viên phòng Phục hồi chức năng và Giám định, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
ThS. Nguyễn Minh Hoàng	Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai
DS. Đỗ Thị Ngát	Chuyên viên phòng Nghiệp vụ, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
BsCKII. Cao Đức Phương	Chuyên viên chính Phòng Quản lý hành nghề khám bệnh, chữa bệnh, Cục QLKCB
ThS. Đỗ Thị Huyền Trang	Cục Quản lý Khám, chữa bệnh

LỜI NÓI ĐẦU

Hướng dẫn quy trình kỹ thuật là tài liệu chuyên môn hướng dẫn thực hiện kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh trên lâm sàng, đồng thời là tài liệu để hỗ trợ công tác giảng dạy, đào tạo thực hiện kỹ thuật. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật được Bộ Y tế ban hành nhằm chuẩn hóa thực hiện quy trình kỹ thuật tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh. Đây là công cụ để làm căn cứ đánh giá sự tuân thủ thực hiện kỹ thuật hoặc kiểm định lâm sàng, xác định rõ các hoạt động cần phải thực hiện, phân công rõ trách nhiệm, kiểm tra giám sát và bố trí hợp lý nguồn lực, giảm thiểu tối đa biến cố bất lợi.

Để chuẩn hóa quy trình kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh về Dị ứng - Miễn dịch, Bộ Y tế đã giao bệnh viện Bạch Mai làm đầu mối xây dựng Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng cùng các bệnh viện E, bệnh viện Nhi Trung ương, bệnh viện 108,... Các bệnh viện được giao đã huy động và phân công các giáo sư, phó giáo sư, tiến sĩ, bác sĩ chuyên khoa Dị ứng – Miễn dịch lâm sàng biên soạn Hướng dẫn quy trình kỹ thuật; tổ chức họp hội đồng khoa học trong bệnh viện để nghiệm thu; 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 trên các 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 Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng với sự tham gia của một số Vụ, Cục chức năng của Bộ Y tế, các chuyên gia hàng đầu về Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng. 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 Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng - Tập 2 được xây dựng cho các kỹ thuật có trong Phụ lục số 02 nhưng 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 nghiệm thu với tổng số 24 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 Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, đặc biệt là tập thể lãnh đạo và nhóm thư ký biên soạn và nghiệm thu của Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch, 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 phố Giảng Võ, phường Giảng Võ, Hà Nội.

Xin trân trọng cảm ơn!

GS.TS. Trần Văn Thuấn
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 Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng - Tập 2 được xây dựng và ban hành cho các kỹ thuật có trong Phụ lục số 02 nhưng 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

MỤC LỤC

DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

PHỤ LỤC: DANH MỤC KỸ THUẬT VỀ DỊ ỨNG - MIỄN DỊCH LÂM SÀNG

1. Định lượng kháng thể kháng Actin.....	1
2. Định lượng kháng thể kháng kháng nguyên gan hòa tan – anti SLA.....	10
3. Định lượng kháng thể kháng kháng nguyên gan tụy - anti LP	19
4. Định lượng kháng thể kháng Gliadin	28
5. Định lượng kháng thể kháng AChR Ab	37
6. Định lượng kháng thể kháng MuSK.....	46
7. Định lượng kháng thể kháng cơ trơn (SM).....	55
8. Định lượng kháng thể kháng NMDA	64
9. Glutamate receptor (type NMDA) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang ...	73
10. Glutamate receptor (type AMPA1) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang	83
11. Glutamate receptor (type AMPA2) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang ..	93
12. Glutamate receptor (type AMPA1/2) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang .	103
13. Contactin- associated protein 2 (CASPR2) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang.....	113
14. Dipeptidyl aminopeptidase - like protein 6 (DPPX) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang.....	123
15. Leucine- rich glioma- inactivated protein 1 (LGI1) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang.....	133
16. Gabab receptor (GABAR1/B2) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang.....	143
17. Tự kháng thể trong bệnh viêm não bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang ..	153
18. Đa tự kháng thể trong bệnh viêm não bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang (2 loại)...	163
19. Đa tự kháng thể trong bệnh viêm não bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang (6 loại)...	173
20. Đa tự kháng thể trong bệnh viêm màng thận nguyên phát bằng miễn dịch huỳnh quang (2 loại)	183
21. Tự kháng thể: GBM (kháng thể trong hội chứng Goodpasture's) bằng miễn dịch huỳnh quang.....	193
22. Đa tự kháng thể ganglioside trong bệnh thần kinh bằng kỹ thuật sắc ký thanh giấy.....	203
23. Đa tự kháng thể trong hội chứng thần kinh cận u bằng kỹ thuật sắc ký thanh giấy.....	212
24. Tiêm hoặc truyền các chế phẩm sinh học	220

DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AChR Ab	Anti-acetylcholine receptor antibody	Kháng thể kháng thụ thể Acetylcholine
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải
ANA	Anti nuclear antibody	Kháng thể kháng nhân
ANCA	Anti Neutrophil Cytoplasmic Antibody	Kháng thể kháng bạch cầu đa nhân trung tính
ASA/NSAIDs		Aspirin và các thuốc chống viêm không Steroid
AMA - M2	Anti-mitochondrial M2 Antibody	Kháng thể kháng kháng nguyên M2 ở ty lạp thể
ASGPR	Asialoglycoprotein receptor	Kháng thể kháng thụ thể Glycoprotein ở người Châu Á
AZT	Azidothymidine	
C	Complement	Bổ thể
CCP	Cyclic Citrunilate Peptide	Peptid Citrullin vòng
C ₁ INH	C ₁ Inhibitor	Chất ức chế C ₁ Esterase
CNHH	Chức năng hô hấp	
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease	Bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính
DRESS	Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms	Ban đỏ tăng bạch cầu ái toan và triệu chứng toàn thân do thuốc
DsDNA	Double strains desoxyribonucleic acid	Chuỗi kép DNA
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay	Phương pháp hấp phụ miễn dịch gắn men
ENA	Extractable Nuclear Antigen	Kháng nguyên chiết xuất từ nhân
EPO	Erythroprotein	
ESCD	European Society of Contact Dermatitis	Hội viêm da tiếp xúc Châu Âu
FeNO	Fraction of exhaled nitric oxide	
FEV1	Forced Expiratory volume during 1 st second	Thể tích thở ra gắng sức trong giây đầu tiên
FEV1/FVC	Gaensler ratio:	Chỉ số Gaensler
FRC	Functional residual capacity	Dung tích cặn chức năng
FVC	Forced vital capacity	Dung tích sống gắng sức
SJS/TEN	Hội chứng Stevens - Johnson	Hoại tử thượng bì nhiễm độc
GMC		Giải mẫn cảm
GBM	Glomerular basement membrane	Kháng thể kháng màng đáy cầu thận

HCSP		Hóa chất sinh phẩm
HPQ		Hen phế quản
IVIg	Intravenous Immunoglobulin	Globulin miễn dịch truyền tĩnh mạch
KN	Kháng nguyên	
KT	Kháng thể	
LP	Liver and Pancreas antigen	Kháng nguyên gan tụy
MPO	Myeloperoxidase	
MVV	Maximal voluntary ventilation	Thông khí tự ý tối đa
NMDA	N-Methyl-D-aspartic acid	
QC	Quality Control	
FITC	Fluorescein isothiocyanate	Chất phát huỳnh quang Isothiocyanate
PEF	Peak expiratory flow	Lưu lượng đỉnh thở ra
PR3	Proteinase 3	
MuSK	Muscle-specific kinase	Kinase đặc hiệu cơ
RNP-70	Ribonucleoprotein-70	
RNA	Ribonucleic acid	Axit Ribonucleic
RV	Residual volume	Thể tích khí cặn
Scl-70	Topoisomerase antigen 70 kD	Kháng nguyên Topoisomerase 70 kD
Sm	Smith	
SLE	Systemic lupus erythematosus	Lupus ban đỏ hệ thống
SLA	Soluble liver antigen	Kháng nguyên gan hòa tan
SSA	Sjögren's-syndrome-related antigen A	Kháng nguyên liên quan hội chứng Sjögren type A
SSB	Sjögren's-syndrome-related antigen B	Kháng nguyên liên quan hội chứng Sjögren type B
TLC	Total lung capacity	Dung tích phổi toàn phần
VC	Vital capacity	Dung tích sống

PHỤ LỤC
DANH MỤC KỸ THUẬT VỀ DỊ ỨNG - MIỄN DỊCH LÂM SÀNG

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)
1	38		Định lượng kháng thể kháng Actin
2	39		Định lượng kháng thể kháng kháng nguyên gan hòa tan - Anti SLA
3	40		Định lượng kháng thể kháng kháng nguyên gan tụy - Anti LP
4	41		Định lượng kháng thể kháng Gliadin
5	42		Định lượng kháng thể kháng AChR Ab
6	43		Định lượng kháng thể kháng MuSK
7	44		Định lượng kháng thể kháng cơ trơn (SM)
8	45		Định lượng kháng thể kháng NMDA
9	46		Glutamate receptor (type NMDA) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang
10	47		Glutamate receptor (type AMPA1) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang
11	48		Glutamate receptor (type AMPA2) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang
12	49		Glutamate receptor (type AMPA1/2) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang
13	50		Contactin-associated protein 2 (CASPR2) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang
14	51		Dipeptidyl aminopeptidase - like protein 6 (DPPX) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang
15	52		Leucine - rich glioma - inactivated protein 1 (LGI1) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang
16	53		GABAB receptor (GABARB1/B2) viêm não tự miễn miễn dịch huỳnh quang
17	56		Tự kháng thể trong bệnh viêm não bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang
18	57		Đa tự kháng thể trong bệnh viêm não bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang (2 loại)
19	58		Đa tự kháng thể trong bệnh viêm não bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang (6 loại)
20	59		Đa tự kháng thể trong bệnh viêm màng thận nguyên phát bằng miễn dịch huỳnh quang (2 loại)

21	60		Tự kháng thể: GBM (kháng thể trong hội chứng Goodpasture's) bằng miễn dịch huỳnh quang
22	62		Đa tự kháng thể ganglioside trong bệnh thần kinh bằng kỹ thuật sắc ký thanh giấy
23	63		Đa tự kháng thể trong hội chứng thần kinh cận u bằng kỹ thuật sắc ký thanh giấy
24	120		Tiêm hoặc truyền các chế phẩm sinh học

phuongcd.kcb_Cao Duc Phuong 20/08/2025 16:16:27

1. ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG ACTIN

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng thể Actin trong huyết thanh bệnh nhân như một tiêu chuẩn hỗ trợ trong chẩn đoán xơ gan mật nguyên phát.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA là dựa vào sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên – kháng thể. Kháng nguyên tinh khiết được gắn vào giếng, sau đó cho thêm huyết thanh có chứa kháng thể cần phát hiện. Bổ sung kháng thể có gắn enzyme, thêm vào cơ chất tạo tín hiệu màu. Tín hiệu màu có thể xác định được bằng phương pháp đo mật độ quang. Mức độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ kháng thể có mặt trong huyết thanh bệnh nhân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1 Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Chai thủy tinh nút mài
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2 Hóa chất, thuốc thử

- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Dung dịch rửa máy xét nghiệm
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm

- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Hóa chất sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất 2 lần

2.2.3 Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Máy đọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Vật tư thay thế hệ thống thủy
- Vật tư thay thế hệ thống quang
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy xét nghiệm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô

- Tủ âm 37°C
- Máy ly tâm
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng ngâm dụng cụ bẩn,...

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Ống không có chất chống đông: thể tích 3-5ml, mẫu máu không bị đục, không vỡ hồng cầu;
 - + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 -3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng.
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Để tránh hiện tượng bay hơi hóa chất sinh phẩm chẩn đoán, hóa chất sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng nên phân tích trong vòng 2h.
- Hộp chứa 96 giếng đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Các loại chứng bao gồm các nồng độ.
- Chứng dương tính và chứng âm tính.
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm.
- Dung dịch rửa.
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Chuẩn bị pha loãng bệnh phẩm: pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch pha loãng bệnh phẩm dạng cô đặc (pha loãng 5 lần) với nước cất hai lần. Bảo quản tủ lạnh 2 -8°C trong 30 ngày.
- Chuẩn bị dung dịch rửa: pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch rửa dạng cô đặc (pha loãng gấp 50 lần) với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2 -8°C trong 30 ngày.

- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (huyết thanh bệnh nhân) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với dung dịch pha loãng bệnh phẩm trước khi làm xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị đủ số giếng cần thiết với những mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng.
- Cho 100µl mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Rửa toàn bộ giếng để loại bỏ những kháng thể trong huyết thanh không gắn kết. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm vào 100µl dung dịch cộng hợp vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Loại bỏ những thành phần thừa trong những giếng. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm 100µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng 5'.
- Khởi động và chọn các chương trình phần mềm của các máy theo các loại xét nghiệm được yêu cầu.
- Đo mật độ quang học của mẫu.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:
- Dựa theo tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm kháng thể kháng Actin của nhà sản xuất để nhận định kết quả:
- ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

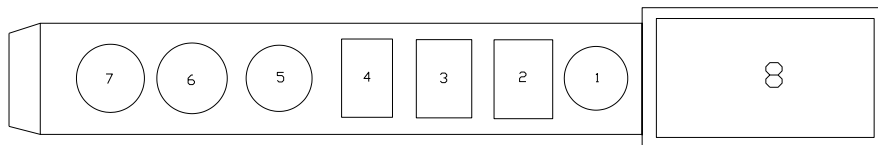
- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối thiểu 5 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- 1 hộp hóa chất chứa 6 túi, mỗi túi gồm 6 thanh test đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Dung dịch rửa.
- Mẫu calibration, mẫu control
- Cấu tạo thanh test:



Vị trí số 1: giếng trống khu vực nhỏ huyết thanh

Vị trí số 2: chất cộng hợp

Vị trí số 3: dung dịch pha loãng

Vị trí số 4: dung dịch cơ chất

Vị trí số 5: giếng không tráng kháng nguyên

Vị trí số 6: giếng tráng kháng nguyên

Vị trí số 7: giếng trống

Vị trí số 8: khu vực mã code

- Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng dung dịch rửa dạng cô đặc theo tỉ lệ khuyến cáo của hãng với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Kiểm tra đối chiếu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Chuẩn bị đủ loại thanh test tương ứng với các chỉ định xét nghiệm cần thiết với mẫu chứng, mẫu bệnh phẩm.
- Cho 50µl mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm vào test
- Cho thanh test vào đúng vị trí quy định trên máy.
- Chít mã code cho mỗi thanh test
- Các bước tiến hành dựa theo quy trình khuyến cáo chạy máy do hãng máy cung cấp.
- Kết quả xét nghiệm được tự động chuyển sang máy tính.
- Rửa máy hàng ngày sau khi kết thúc quá trình xét nghiệm
- Rửa máy tuần vào 1 ngày cố định trong tuần.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:

Dựa vào tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm định lượng kháng thể kháng Actin của nhà sản xuất để nhận định kết quả:

 - ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

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

- Chất lượng của mẫu bệnh phẩm:

- + Huyết thanh vàng
- + Huyết thanh tan huyết
- + Huyết thanh đục

Giải pháp: Không sử dụng mẫu máu bị tan máu để làm xét nghiệm; đối với mẫu máu vàng, đục bất thường do bệnh lý cần hòa loãng bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm.

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..)

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào giếng phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Giải pháp:

- + Thực hiện lại quy trình, đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên
- + Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Castro c, gourley m. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J allergy clin immunol. 2010, 125(2 suppl 2):s238-47.

2. Kumar y, bhatia a, walker minz r. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagn pathol. 2009 jan 2;4:1.
3. Bossuyt x, de langhe e, borghi mo, meroni pl. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. Nat rev rheumatol. 2020;16(12):715-726.
4. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
5. Hovhannes hayrapetyan, thao tran, eglis tellez-corrales, charitha madiraju. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. Methods mol biol. 2023;2612:1-17.

phuongcd.kcb - Cao Thi Thuong - 22/10/2023 16:27

2. ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG KHÁNG NGUYÊN GAN HÒA TAN – ANTI SLA

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng thể SLA trong huyết thanh bệnh nhân như một tiêu chuẩn hỗ trợ trong chẩn đoán viêm gan tự miễn type 3.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA là dựa vào sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên – kháng thể. Kháng nguyên tinh khiết được gắn vào giếng, sau đó cho thêm huyết thanh có chứa kháng thể cần phát hiện. Bổ sung kháng thể có gắn enzyme, thêm vào cơ chất tạo tín hiệu màu. Tín hiệu màu có thể xác định được bằng phương pháp đo mật độ quang. Mức độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ kháng thể có mặt trong huyết thanh bệnh nhân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1 Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Chai thủy tinh nút mài
- Ống đồng thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2 Hóa chất, thuốc thử

- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Dung dịch rửa máy xét nghiệm
- Hóa chất nội kiểm

- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Hóa chất sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất 2 lần

2.2.3 Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Máy đọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Vật tư thay thế hệ thống thủy
- Vật tư thay thế hệ thống quang
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy xét nghiệm
- Tủ lạnh lưu mẫu

- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút âm
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng ngâm dụng cụ bẩn,...

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Ống không có chất chống đông: thể tích 3-5ml, mẫu máu không bị đục, không vỡ hồng cầu;
 - + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 -3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;

- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Để tránh hiện tượng bay hơi hóa chất sinh phẩm chẩn đoán, hóa chất sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng nên phân tích trong vòng 2h.
- Hộp chứa 96 giếng đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Các loại chứng bao gồm các nồng độ.
- Chứng dương tính và chứng âm tính.
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm.
- Dung dịch rửa.
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Chuẩn bị pha loãng bệnh phẩm: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch pha loãng bệnh phẩm dạng cô đặc (pha loãng 5 lần) với nước cất hai lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

- Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng phần chứa trong mỗi lọ của dung dịch rửa dạng cô đặc (pha loãng gấp 50 lần) với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (huyết thanh bệnh nhân) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với dung dịch pha loãng bệnh phẩm trước khi làm xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị đủ số giếng cần thiết với những mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng.
- Cho 100µl mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30’
- Rửa toàn bộ giếng để loại bỏ những kháng thể trong huyết thanh không gắn kết. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm vào 100µl dung dịch cộng hợp vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30’
- Loại bỏ những thành phần thừa trong những giếng. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm 100µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30’
- Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng 5’.
- Khởi động và chọn các chương trình phần mềm của các máy theo các loại xét nghiệm được yêu cầu.
- Đo mật độ quang học của mẫu.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:
- Dựa theo tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm kháng thể kháng kháng nguyên gan hòa tan – anti SLA của nhà sản xuất để nhận định kết quả:

- ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
- ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

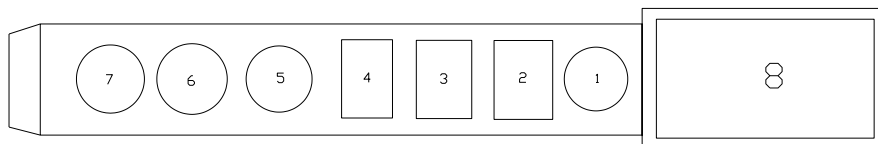
- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2- 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- 1 hộp hóa chất chứa 6 túi, mỗi túi gồm 6 thanh test đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Dung dịch rửa.
- Mẫu calibration, mẫu control
- Cấu tạo thanh test:



Vị trí số 1: giếng trống khu vực nhỏ huyết thanh

Vị trí số 2: chất cộng hợp

Vị trí số 3: dung dịch pha loãng

Vị trí số 4: dung dịch cơ chất

Vị trí số 5: giếng không tráng kháng nguyên

Vị trí số 6: giếng tráng kháng nguyên

Vị trí số 7: giếng trống

Vị trí số 8: khu vực mã code

- Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng dung dịch rửa dạng cô đặc theo tỉ lệ khuyến cáo của hãng với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Kiểm tra đối chiếu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Chuẩn bị đủ loại thanh test tương ứng với các chỉ định xét nghiệm cần thiết với mẫu chứng, mẫu bệnh phẩm.
- Cho 50µl mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm vào test
- Cho thanh test vào đúng vị trí quy định trên máy.
- Chít mã code cho mỗi thanh test
- Các bước tiến hành dựa theo quy trình khuyến cáo chạy máy do hãng máy cung cấp.
- Kết quả xét nghiệm được tự động chuyển sang máy tính.
- Rửa máy hàng ngày sau khi kết thúc quá trình xét nghiệm
- Rửa máy tuần vào 1 ngày cố định trong tuần.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu qc tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:
- Dựa vào tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm định lượng kháng thể kháng kháng nguyên gan hòa tan – anti SLA của nhà sản xuất để nhận định kết quả:
- ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

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

- Chất lượng của mẫu bệnh phẩm:

- + Huyết thanh vàng
- + Huyết thanh tan huyết
- + Huyết thanh đục

Giải pháp: Không sử dụng mẫu máu bị tan máu để làm xét nghiệm; đối với mẫu máu vàng, đục bất thường do bệnh lý cần hòa loãng bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm.

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..)

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào giếng phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Giải pháp:

- + Thực hiện lại quy trình, đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên
- + Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Castro c, gourley m. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J allergy clin immunol. 2010, 125(2 suppl 2):s238-47.

2. Kumar y, bhatia a, walker minz r. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagn pathol. 2009 jan 2;4:1.
3. Bossuyt x, de langhe e, borghi mo, meroni pl. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. Nat rev rheumatol. 2020;16(12):715-726.
4. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
5. Hovhannes hayrapetyan, thao tran, eglis tellez-corrales, charitha madiraju. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. Methods mol biol. 2023;2612:1-17.

3. ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG KHÁNG NGUYÊN GAN TỤY - ANTI LP

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng thể LP trong huyết thanh bệnh nhân như một tiêu chuẩn hỗ trợ trong chẩn đoán xơ gan mật nguyên phát.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA là dựa vào sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên – kháng thể. Kháng nguyên tinh khiết được gắn vào giếng, sau đó cho thêm huyết thanh có chứa kháng thể cần phát hiện. Bổ sung kháng thể có gắn enzyme, thêm vào cơ chất tạo tín hiệu màu. Tín hiệu màu có thể xác định được bằng phương pháp đo mật độ quang. Mức độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ kháng thể có mặt trong huyết thanh bệnh nhân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1 Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Chai thủy tinh nút mài
- Ống đông thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2 Hóa chất, thuốc thử

- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Dung dịch rửa máy xét nghiệm
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm

- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Hóa chất sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất 2 lần

2.2.3 Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Máy đọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Vật tư thay thế hệ thống thủy
- Vật tư thay thế hệ thống quang
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy xét nghiệm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất

- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng ngâm dụng cụ bẩn,...

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Ống không có chất chống đông: thể tích 3-5ml, mẫu máu không bị đục, không vỡ hồng cầu;
 - + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 – 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: Nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Để tránh hiện tượng bay hơi hóa chất sinh phẩm chẩn đoán, hóa chất sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng nên phân tích trong vòng 2h.
- Hộp chứa 96 giếng đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Các loại chứng bao gồm các nồng độ.
- Chứng dương tính và chứng âm tính.
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm.
- Dung dịch rửa.
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Chuẩn bị pha loãng bệnh phẩm: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch pha loãng bệnh phẩm dạng cô đặc (pha loãng 5 lần) với nước cất hai lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.
- Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch rửa dạng cô đặc (pha loãng gấp 50 lần) với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (huyết thanh bệnh nhân) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với dung dịch pha loãng bệnh phẩm trước khi làm xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị đủ số giếng cần thiết với những mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng.
- Cho 100µl mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30’
- Rửa toàn bộ giếng để loại bỏ những kháng thể trong huyết thanh không gắn kết. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm vào 100µl dung dịch cộng hợp vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30’
- Loại bỏ những thành phần thừa trong những giếng. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm 100µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30’
- Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng 5’.
- Khởi động và chọn các chương trình phần mềm của các máy theo các loại xét nghiệm được yêu cầu.
- Đo mật độ quang học của mẫu.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:

Dựa theo tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm kháng thể kháng nguyên gan tụy – anti LP của nhà sản xuất để nhận định kết quả:

 - ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

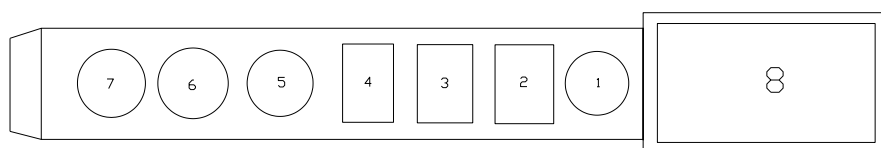
- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- 1 hộp hóa chất chứa 6 túi, mỗi túi gồm 6 thanh test đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Dung dịch rửa.
- Mẫu calibration, mẫu control
- Cấu tạo thanh test:



Vị trí số 1: giếng trống khu vực nhỏ huyết thanh

Vị trí số 2: chất cộng hợp

Vị trí số 3: dung dịch pha loãng

Vị trí số 4: dung dịch cơ chất

Vị trí số 5: giếng không tráng kháng nguyên

Vị trí số 6: giếng tráng kháng nguyên

Vị trí số 7: giếng trống

Vị trí số 8: khu vực mã code

- Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng dung dịch rửa dạng cô đặc theo tỉ lệ khuyến cáo của hãng với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Kiểm tra đối chiếu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Chuẩn bị đủ loại thanh test tương ứng với các chỉ định xét nghiệm cần thiết với mẫu chứng, mẫu bệnh phẩm.
- Cho 50µl mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm vào test
- Cho thanh test vào đúng vị trí quy định trên máy.
- Chit mã code cho mỗi thanh test
- Các bước tiến hành dựa theo quy trình khuyến cáo chạy máy do hãng máy cung cấp.
- Kết quả xét nghiệm được tự động chuyển sang máy tính.
- Rửa máy hàng ngày sau khi kết thúc quá trình xét nghiệm
- Rửa máy tuần vào 1 ngày cố định trong tuần.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:
- Dựa vào tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm định lượng kháng thể kháng kháng nguyên gan tụy – Anti LP của nhà sản xuất để nhận định kết quả:
- ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

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

- Chất lượng của mẫu bệnh phẩm:

- + Huyết thanh vàng
- + Huyết thanh tan huyết
- + Huyết thanh đục

Giải pháp: Không sử dụng mẫu máu bị tan máu để làm xét nghiệm; đối với mẫu máu vàng, đục bất thường do bệnh lý cần hòa loãng bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm.

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..)

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào giếng phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Giải pháp:

- + Thực hiện lại quy trình, đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên
- + Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Castro c, gourley m. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J allergy clin immunol. 2010, 125(2 suppl 2):s238-47.

2. Kumar y, bhatia a, walker minz r. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagn pathol. 2009 jan 2;4:1.
3. Bossuyt x, de langhe e, borghi mo, meroni pl. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. Nat rev rheumatol. 2020;16(12):715-726.
4. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
5. Hovhannes hayrapetyan, thao tran, eglis tellez-corrales, charitha madiraju. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. Methods mol biol. 2023;2612:1-17.

4. ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG GLIADIN

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng thể kháng Gliadin trong huyết thanh bệnh nhân như một tiêu chuẩn hỗ trợ trong chẩn đoán bệnh Celiac-không dung nạp Gluten.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA là dựa vào sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên - kháng thể. Kháng nguyên tinh khiết được gắn vào giếng, sau đó cho thêm huyết thanh có chứa kháng thể cần phát hiện. Bổ sung kháng thể có gắn enzyme, thêm vào cơ chất tạo tín hiệu màu. Tín hiệu màu có thể xác định được bằng phương pháp đo mật độ quang. Mức độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ kháng thể có mặt trong huyết thanh bệnh nhân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1 Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Chai thủy tinh nút mài
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2 Hóa chất, thuốc thử

- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Dung dịch rửa máy xét nghiệm
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm

- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Hóa chất sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất 2 lần

2.2.3 Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Máy đọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Vật tư thay thế hệ thống thủy
- Vật tư thay thế hệ thống quang
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy xét nghiệm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất

- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng ngâm dụng cụ bẩn,...

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Ống không có chất chống đông: thể tích 3-5ml, mẫu máu không bị đục, không vỡ hồng cầu;
 - + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: Tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 – 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: Nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Để tránh hiện tượng bay hơi hóa chất sinh phẩm chẩn đoán, hóa chất sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng nên phân tích trong vòng 2h.
- Hộp chứa 96 giếng đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Các loại chứng bao gồm các nồng độ.
- Chứng dương tính và chứng âm tính.
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm.
- Dung dịch rửa.
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Chuẩn bị pha loãng bệnh phẩm: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch pha loãng bệnh phẩm dạng cô đặc (pha loãng 5 lần) với nước cất hai lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.
- Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch rửa dạng cô đặc (pha loãng gấp 50 lần) với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (huyết thanh bệnh nhân) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với dung dịch pha loãng bệnh phẩm trước khi làm xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị đủ số giếng cần thiết với những mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng.
- Cho 100µl mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30’
- Rửa toàn bộ giếng để loại bỏ những kháng thể trong huyết thanh không gắn kết. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm vào 100µl dung dịch cộng hợp vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30’
- Loại bỏ những thành phần thừa trong những giếng. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm 100µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30’
- Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng 5’.
- Khởi động và chọn các chương trình phần mềm của các máy theo các loại xét nghiệm được yêu cầu.
- Đo mật độ quang học của mẫu.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu qc khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:
- Dựa theo tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm kháng thể kháng Gliadin của nhà sản xuất để nhận định kết quả:
- ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

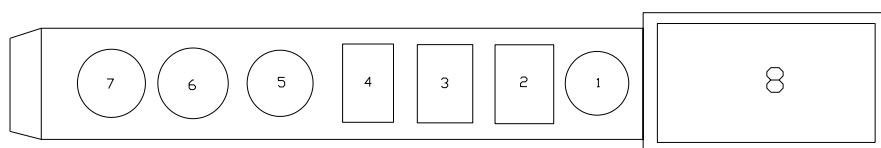
- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- 1 hộp hóa chất chứa 6 túi, mỗi túi gồm 6 thanh test đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Dung dịch rửa.
- Mẫu calibration, mẫu control
- Cấu tạo thanh test:



Vị trí số 1: giếng trống khu vực nhỏ huyết thanh

Vị trí số 2: chất cộng hợp

Vị trí số 3: dung dịch pha loãng

Vị trí số 4: dung dịch cơ chất

Vị trí số 5: giếng không tráng kháng nguyên

Vị trí số 6: giếng tráng kháng nguyên

Vị trí số 7: giếng trống

Vị trí số 8: khu vực mã code

- Chuẩn bị dung dịch rửa: pha loãng dung dịch rửa dạng cô đặc theo tỉ lệ khuyến cáo của hãng với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Kiểm tra đối chiếu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Chuẩn bị đủ loại thanh test tương ứng với các chỉ định xét nghiệm cần thiết với mẫu chứng, mẫu bệnh phẩm.
- Cho 50µl mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm vào test
- Cho thanh test vào đúng vị trí quy định trên máy.
- Chit mã code cho mỗi thanh test
- Các bước tiến hành dựa theo quy trình khuyến cáo chạy máy do hãng máy cung cấp.
- Kết quả xét nghiệm được tự động chuyển sang máy tính.
- Rửa máy hàng ngày sau khi kết thúc quá trình xét nghiệm
- Rửa máy tuần vào 1 ngày cố định trong tuần.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu qc tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:

Dựa vào tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm định lượng kháng thể kháng gliadin của nhà sản xuất để nhận định kết quả:

 - ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

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

- Chất lượng của mẫu bệnh phẩm:

- + Huyết thanh vàng
- + Huyết thanh tan huyết
- + Huyết thanh đục

Giải pháp: Không sử dụng mẫu máu bị tan máu để làm xét nghiệm; đối với mẫu máu vàng, đục bất thường do bệnh lý cần hòa loãng bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm.

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..)

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào giếng phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Giải pháp:

- + Thực hiện lại quy trình, đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên
- + Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Castro c, gourley m. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J allergy clin immunol. 2010, 125(2 suppl 2):s238-47.

2. Kumar y, bhatia a, walker minz r. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagn pathol. 2009 jan 2;4:1.
3. Bossuyt x, de langhe e, borghi mo, meroni pl. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. Nat rev rheumatol. 2020;16(12):715-726.
4. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
5. Hovhannes hayrapetyan, thao tran, eglis tellez-corrales, charitha madiraju. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. Methods mol biol. 2023;2612:1-17.

5. ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG AChR Ab

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng thể kháng AChRAb trong huyết thanh bệnh nhân như một tiêu chuẩn hỗ trợ trong chẩn đoán nhược cơ.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA là dựa vào sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên – kháng thể. Kháng nguyên tinh khiết được gắn vào giếng, sau đó cho thêm huyết thanh có chứa kháng thể cần phát hiện. Bổ sung kháng thể có gắn enzyme, thêm vào cơ chất tạo tín hiệu màu. Tín hiệu màu có thể xác định được bằng phương pháp đo mật độ quang. Mức độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ kháng thể có mặt trong huyết thanh bệnh nhân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1 Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Chai thủy tinh nút mài
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2 Hóa chất, thuốc thử

- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Dung dịch rửa máy xét nghiệm
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm

- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Hóa chất sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất 2 lần

2.2.3 Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Máy đọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Vật tư thay thế hệ thống thủy
- Vật tư thay thế hệ thống quang
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy xét nghiệm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô

- Tủ âm 37°C
- Máy ly tâm
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút âm
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng ngâm dụng cụ bẩn,...

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Ống không có chất chống đông: thể tích 3-5ml, mẫu máu không bị đục, không vỡ hồng cầu;
 - + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 – 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Để tránh hiện tượng bay hơi hóa chất sinh phẩm chẩn đoán, hóa chất sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng nên phân tích trong vòng 2h.
- Hộp chứa 96 giếng đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Các loại chứng bao gồm các nồng độ.
- Chứng dương tính và chứng âm tính.
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm.
- Dung dịch rửa.
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Chuẩn bị pha loãng bệnh phẩm: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch pha loãng bệnh phẩm dạng cô đặc (pha loãng 5 lần) với nước cất hai lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.
- Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch rửa dạng cô đặc (pha loãng gấp 50 lần) với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (huyết thanh bệnh nhân) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với dung dịch pha loãng bệnh phẩm trước khi làm xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị đủ số giếng cần thiết với những mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng.
- Cho 100µl mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Rửa toàn bộ giếng để loại bỏ những kháng thể trong huyết thanh không gắn kết. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm vào 100µl dung dịch cộng hợp vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Loại bỏ những thành phần thừa trong những giếng. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm 100µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng 5'.
- Khởi động và chọn các chương trình phần mềm của các máy theo các loại xét nghiệm được yêu cầu.
- Đo mật độ quang học của mẫu.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:
- Dựa theo tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm kháng thể kháng AChR Ab của nhà sản xuất để nhận định kết quả:
- ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

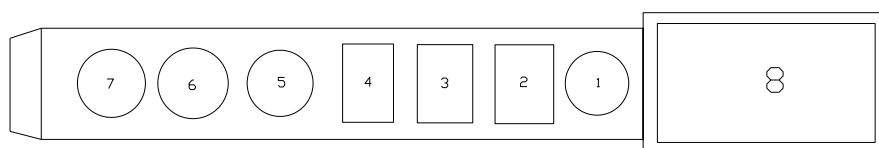
- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- 1 hộp hóa chất chứa 6 túi, mỗi túi gồm 6 thanh test đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Dung dịch rửa.
- Mẫu calibration, mẫu control
- Cấu tạo thanh test:



Vị trí số 1: giếng trống khu vực nhỏ huyết thanh

Vị trí số 2: chất cộng hợp

Vị trí số 3: dung dịch pha loãng

Vị trí số 4: dung dịch cơ chất

Vị trí số 5: giếng không tráng kháng nguyên

Vị trí số 6: giếng tráng kháng nguyên

Vị trí số 7: giếng trống

Vị trí số 8: khu vực mã code

- Chuẩn bị dung dịch rửa: pha loãng dung dịch rửa dạng cô đặc theo tỉ lệ khuyến cáo của hãng với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Kiểm tra đối chiếu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Chuẩn bị đủ loại thanh test tương ứng với các chỉ định xét nghiệm cần thiết với mẫu chứng, mẫu bệnh phẩm.
- Cho 50µl mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm vào test
- Cho thanh test vào đúng vị trí quy định trên máy.
- Chit mã code cho mỗi thanh test
- Các bước tiến hành dựa theo quy trình khuyến cáo chạy máy do hãng máy cung cấp.
- Kết quả xét nghiệm được tự động chuyển sang máy tính.
- Rửa máy hàng ngày sau khi kết thúc quá trình xét nghiệm
- Rửa máy tuần vào 1 ngày cố định trong tuần.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:

Dựa vào tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm định lượng kháng thể kháng AChR Ab của nhà sản xuất để nhận định kết quả:

 - ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

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

- Chất lượng của mẫu bệnh phẩm:

- + Huyết thanh vàng
- + Huyết thanh tan huyết
- + Huyết thanh đục

Giải pháp: Không sử dụng mẫu máu bị tan máu để làm xét nghiệm; đối với mẫu máu vàng, đục bất thường do bệnh lý cần hòa loãng bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm.

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..)

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào giếng phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Giải pháp:

- + Thực hiện lại quy trình, đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên
- + Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Castro c, gourley m. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J allergy clin immunol. 2010, 125(2 suppl 2):s238-47.

2. Kumar y, bhatia a, walker minz r. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagn pathol. 2009 jan 2;4:1.
3. Bossuyt x, de langhe e, borghi mo, meroni pl. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. Nat rev rheumatol. 2020;16(12):715-726.
4. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
5. Hovhannes hayrapetyan, thao tran, eglis tellez-corrales, charitha madiraju. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. Methods mol biol. 2023;2612:1-17.

6. ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG MuSK

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng thể kháng MuSK trong huyết thanh bệnh nhân như một tiêu chuẩn hỗ trợ trong chẩn đoán nhược cơ.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA là dựa vào sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên – kháng thể. Kháng nguyên tinh khiết được gắn vào giếng, sau đó cho thêm huyết thanh có chứa kháng thể cần phát hiện. Bổ sung kháng thể có gắn enzyme, thêm vào cơ chất tạo tín hiệu màu. Tín hiệu màu có thể xác định được bằng phương pháp đo mật độ quang. Mức độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ kháng thể có mặt trong huyết thanh bệnh nhân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1 Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Chai thủy tinh nút mài
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2 Hóa chất, thuốc thử

- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Dung dịch rửa máy xét nghiệm
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm

- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Hóa chất sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất 2 lần

2.2.3 Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Máy đọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Vật tư thay thế hệ thống thủy
- Vật tư thay thế hệ thống quang
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy xét nghiệm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô

- Tủ âm 37°C
- Máy ly tâm
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng ngâm dụng cụ bẩn,...

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông.
 - Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống không có chất chống đông: Thể tích 3-5ml, mẫu máu không bị đục, không vỡ hồng cầu;
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: Tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 - 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Để tránh hiện tượng bay hơi hóa chất sinh phẩm chẩn đoán, hóa chất sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng nên phân tích trong vòng 2h.
- Hộp chứa 96 giếng đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Các loại chứng bao gồm các nồng độ.
- Chứng dương tính và chứng âm tính.
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm.
- Dung dịch rửa.
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Chuẩn bị pha loãng bệnh phẩm: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch pha loãng bệnh phẩm dạng cô đặc (pha loãng 5 lần) với nước cất hai lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.
- Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch rửa dạng cô đặc (pha loãng gấp 50 lần) với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (huyết thanh bệnh nhân) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với dung dịch pha loãng bệnh phẩm trước khi làm xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị đủ số giếng cần thiết với những mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng.
- Cho 100µl mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Rửa toàn bộ giếng để loại bỏ những kháng thể trong huyết thanh không gắn kết. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm vào 100µl dung dịch cộng hợp vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Loại bỏ những thành phần thừa trong những giếng. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm 100µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng 5'.
- Khởi động và chọn các chương trình phần mềm của các máy theo các loại xét nghiệm được yêu cầu.
- Đo mật độ quang học của mẫu.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:
- Dựa theo tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm kháng thể kháng MuSK của nhà sản xuất để nhận định kết quả:
- ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

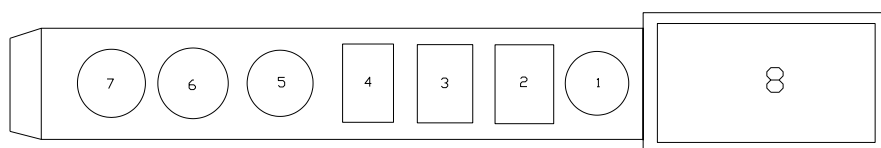
- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- 1 hộp hóa chất chứa 6 túi, mỗi túi gồm 6 thanh test đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Dung dịch rửa.
- Mẫu calibration, mẫu control
- Cấu tạo thanh test:



Vị trí số 1: giếng trống khu vực nhỏ huyết thanh

Vị trí số 2: chất cộng hợp

Vị trí số 3: dung dịch pha loãng

Vị trí số 4: dung dịch cơ chất

Vị trí số 5: giếng không tráng kháng nguyên

Vị trí số 6: giếng tráng kháng nguyên

Vị trí số 7: giếng trống

Vị trí số 8: khu vực mã code

- Chuẩn bị dung dịch rửa: pha loãng dung dịch rửa dạng cô đặc theo tỉ lệ khuyến cáo của hãng với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2 -8°C trong 30 ngày.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Kiểm tra đối chiếu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Chuẩn bị đủ loại thanh test tương ứng với các chỉ định xét nghiệm cần thiết với mẫu chứng, mẫu bệnh phẩm.
- Cho 50µl mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm vào test
- Cho thanh test vào đúng vị trí quy định trên máy.
- Chit mã code cho mỗi thanh test
- Các bước tiến hành dựa theo quy trình khuyến cáo chạy máy do hãng máy cung cấp.
- Kết quả xét nghiệm được tự động chuyển sang máy tính.
- Rửa máy hàng ngày sau khi kết thúc quá trình xét nghiệm
- Rửa máy tuần vào 1 ngày cố định trong tuần.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:

Dựa vào tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm định lượng kháng thể kháng MuSK của nhà sản xuất để nhận định kết quả:

 - ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

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

- Chất lượng của mẫu bệnh phẩm:

- + Huyết thanh vàng
- + Huyết thanh tan huyết
- + Huyết thanh đục

Giải pháp: Không sử dụng mẫu máu bị tan máu để làm xét nghiệm; đối với mẫu máu vàng, đục bất thường do bệnh lý cần hòa loãng bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm.

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..)

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào giếng phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Giải pháp:

- + Thực hiện lại quy trình, đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên
- + Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Castro c, gourley m. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J allergy clin immunol. 2010, 125(2 suppl 2):s238-47.

2. Kumar y, bhatia a, walker minz r. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagn pathol. 2009 jan 2;4:1.
3. Bossuyt x, de langhe e, borghi mo, meroni pl. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. Nat rev rheumatol. 2020;16(12):715-726.
4. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
5. Hovhannes hayrapetyan, thao tran, eglis tellez-corrales, charitha madiraju. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. Methods mol biol. 2023;2612:1-17.

7. ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG CƠ TRƠN (SM)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng thể kháng cơ trơn (SM) trong huyết thanh bệnh nhân như một tiêu chuẩn hỗ trợ trong chẩn đoán viêm gan tự miễn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA là dựa vào sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên – kháng thể. Kháng nguyên tinh khiết được gắn vào giếng, sau đó cho thêm huyết thanh có chứa kháng thể cần phát hiện. Bổ sung kháng thể có gắn enzyme, thêm vào cơ chất tạo tín hiệu màu. Tín hiệu màu có thể xác định được bằng phương pháp đo mật độ quang. Mức độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ kháng thể có mặt trong huyết thanh bệnh nhân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1 Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Chai thủy tinh nút mài
- Ống đông thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2 Hóa chất, thuốc thử

- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Dung dịch rửa máy xét nghiệm
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm

- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Hóa chất sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất 2 lần

2.2.3 Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Máy đọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Vật tư thay thế hệ thống thủy
- Vật tư thay thế hệ thống quang
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy xét nghiệm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất

- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng ngâm dụng cụ bẩn,...

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống không có chất chống đông: Thể tích 3-5ml, mẫu máu không bị đục, không vỡ hồng cầu;
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: Tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 - 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Để tránh hiện tượng bay hơi hóa chất sinh phẩm chẩn đoán, hóa chất sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng nên phân tích trong vòng 2h.
- Hộp chứa 96 giếng đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Các loại chứng bao gồm các nồng độ.
- Chứng dương tính và chứng âm tính.
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm.
- Dung dịch rửa.
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Chuẩn bị pha loãng bệnh phẩm: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch pha loãng bệnh phẩm dạng cô đặc (pha loãng 5 lần) với nước cất hai lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.
- Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch rửa dạng cô đặc (pha loãng gấp 50 lần) với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (huyết thanh bệnh nhân) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với dung dịch pha loãng bệnh phẩm trước khi làm xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị đủ số giếng cần thiết với những mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng.
- Cho 100µl mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Rửa toàn bộ giếng để loại bỏ những kháng thể trong huyết thanh không gắn kết. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm vào 100µl dung dịch cộng hợp vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Loại bỏ những thành phần thừa trong những giếng. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm 100µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng 5'.
- Khởi động và chọn các chương trình phần mềm của các máy theo các loại xét nghiệm được yêu cầu.
- Đo mật độ quang học của mẫu.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:
- Dựa theo tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm kháng thể kháng cơ trơn (SM) của nhà sản xuất để nhận định kết quả:
- ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

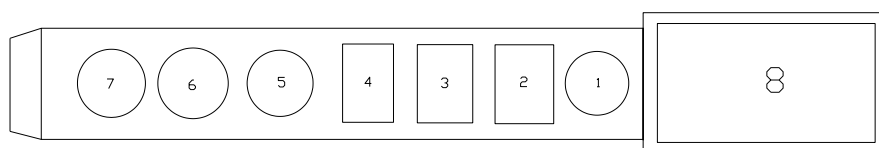
- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- 1 hộp hóa chất chứa 6 túi, mỗi túi gồm 6 thanh test đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Dung dịch rửa.
- Mẫu calibration, mẫu control
- Cấu tạo thanh test:



Vị trí số 1: giếng trống khu vực nhỏ huyết thanh

Vị trí số 2: chất cộng hợp

Vị trí số 3: dung dịch pha loãng

Vị trí số 4: dung dịch cơ chất

Vị trí số 5: giếng không tráng kháng nguyên

Vị trí số 6: giếng tráng kháng nguyên

Vị trí số 7: giếng trống

Vị trí số 8: khu vực mã code

- Chuẩn bị dung dịch rửa: Pha loãng dung dịch rửa dạng cô đặc theo tỉ lệ khuyến cáo của hãng với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Kiểm tra đối chiếu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Chuẩn bị đủ loại thanh test tương ứng với các chỉ định xét nghiệm cần thiết với mẫu chứng, mẫu bệnh phẩm.
- Cho 50µl mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm vào test
- Cho thanh test vào đúng vị trí quy định trên máy.
- Chit mã code cho mỗi thanh test
- Các bước tiến hành dựa theo quy trình khuyến cáo chạy máy do hãng máy cung cấp.
- Kết quả xét nghiệm được tự động chuyển sang máy tính.
- Rửa máy hàng ngày sau khi kết thúc quá trình xét nghiệm
- Rửa máy tuần vào 1 ngày cố định trong tuần.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:
- Dựa vào tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm định lượng kháng thể kháng cơ trơn (SM) của nhà sản xuất để nhận định kết quả:
- ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

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

- Chất lượng của mẫu bệnh phẩm:

- + Huyết thanh vàng
- + Huyết thanh tan huyết
- + Huyết thanh đục

Giải pháp: Không sử dụng mẫu máu bị tan máu để làm xét nghiệm; đối với mẫu máu vàng, đục bất thường do bệnh lý cần hòa loãng bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm.

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..)

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào giếng phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Giải pháp:

- + Thực hiện lại quy trình, đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên
- + Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Castro c, gourley m. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J allergy clin immunol. 2010, 125(2 suppl 2):s238-47.

2. Kumar y, bhatia a, walker minz r. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagn pathol. 2009 jan 2;4:1.
3. Bossuyt x, de langhe e, borghi mo, meroni pl. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. Nat rev rheumatol. 2020;16(12):715-726.
4. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
5. Hovhannes hayrapetyan, thao tran, eglis tellez-corrales, charitha madiraju. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. Methods mol biol. 2023;2612:1-17.

phuongcd.kcb - Cao Thi Thuong - 22/10/2023 16:27

8. ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG NMDA

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng thể kháng NMDA trong huyết thanh bệnh nhân như một tiêu chuẩn hỗ trợ trong chẩn đoán viêm não tự miễn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA là dựa vào sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên – kháng thể. Kháng nguyên tinh khiết được gắn vào giếng, sau đó cho thêm huyết thanh có chứa kháng thể cần phát hiện. Bổ sung kháng thể có gắn enzyme, thêm vào cơ chất tạo tín hiệu màu. Tín hiệu màu có thể xác định được bằng phương pháp đo mật độ quang. Mức độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ kháng thể có mặt trong huyết thanh bệnh nhân.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1 Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Chai thủy tinh nút mài
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2 Hóa chất, thuốc thử

- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Dung dịch rửa máy xét nghiệm
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm

- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Hóa chất sinh phẩm chẩn đoán
- Nước cất 2 lần

2.2.3 Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Máy đọc mật độ quang máy đọc ELISA
- Vật tư thay thế hệ thống thủy
- Vật tư thay thế hệ thống quang
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy xét nghiệm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô

- Tủ âm 37°C
- Máy ly tâm
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng ngâm dụng cụ bẩn,...

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Ống không có chất chống đông: Thể tích 3-5ml, mẫu máu không bị đục, không vỡ hồng cầu;
 - + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: Tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 -3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Để tránh hiện tượng bay hơi hóa chất sinh phẩm chẩn đoán, hóa chất sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng nên phân tích trong vòng 2h.
- Hộp chứa 96 giếng đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Các loại chứng bao gồm các nồng độ.
- Chứng dương tính và chứng âm tính.
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm.
- Dung dịch rửa.
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch dừng phản ứng
- Chuẩn bị pha loãng bệnh phẩm: pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch pha loãng bệnh phẩm dạng cô đặc (pha loãng 5 lần) với nước cất hai lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.
- Chuẩn bị dung dịch rửa: pha loãng phân chứa trong mỗi lọ của dung dịch rửa dạng cô đặc (pha loãng gấp 50 lần) với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (huyết thanh bệnh nhân) theo hướng dẫn của nhà sản xuất với dung dịch pha loãng bệnh phẩm trước khi làm xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị đủ số giếng cần thiết với những mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng.
- Cho 100µl mẫu bệnh phẩm đã được pha loãng vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Rửa toàn bộ giếng để loại bỏ những kháng thể trong huyết thanh không gắn kết. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm vào 100µl dung dịch cộng hợp vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Loại bỏ những thành phần thừa trong những giếng. Rửa 3 lần với 300µl của dung dịch rửa.
- Thêm 100µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng.
- Ủ giếng trong máy ủ ở nhiệt độ 20°C - 25°C thời gian 30'
- Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng 5'.
- Khởi động và chọn các chương trình phần mềm của các máy theo các loại xét nghiệm được yêu cầu.
- Đo mật độ quang học của mẫu.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:
- Dựa theo tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm kháng thể kháng NMDA của nhà sản xuất để nhận định kết quả:
- ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

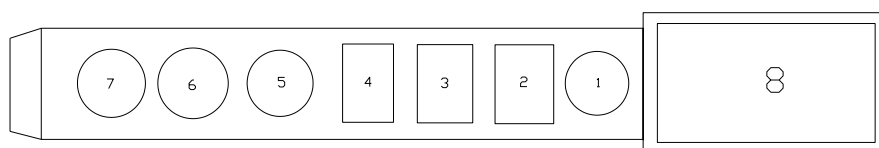
- Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản làm lạnh ở 2 - 8°C cho tối đa 2 ngày hoặc -20°C trong 6 tháng.
- Bệnh phẩm chỉ rã đông 1 lần và phải để bệnh phẩm đạt nhiệt độ phòng trước khi phân tích.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn, không có chất chống đông và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm. Máu không vỡ hồng cầu.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm.

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- 1 hộp hóa chất chứa 6 túi, mỗi túi gồm 6 thanh test đã được gắn kháng nguyên và được bảo quản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm.
- Dung dịch rửa.
- Mẫu calibration, mẫu control
- Cấu tạo thanh test:



Vị trí số 1: giếng trống khu vực nhỏ huyết thanh

Vị trí số 2: chất cộng hợp

Vị trí số 3: dung dịch pha loãng

Vị trí số 4: dung dịch cơ chất

Vị trí số 5: giếng không tráng kháng nguyên

Vị trí số 6: giếng tráng kháng nguyên

Vị trí số 7: giếng trống

Vị trí số 8: khu vực mã code

- Chuẩn bị dung dịch rửa: pha loãng dung dịch rửa dạng cô đặc theo tỉ lệ khuyến cáo của hãng với nước cất 2 lần. Bảo quản tủ lạnh 2-8°C trong 30 ngày.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Kiểm tra đối chiếu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Chuẩn bị đủ loại thanh test tương ứng với các chỉ định xét nghiệm cần thiết với mẫu chứng, mẫu bệnh phẩm.
- Cho 50µl mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm vào test
- Cho thanh test vào đúng vị trí quy định trên máy.
- Chit mã code cho mỗi thanh test
- Các bước tiến hành dựa theo quy trình khuyến cáo chạy máy do hãng máy cung cấp.
- Kết quả xét nghiệm được tự động chuyển sang máy tính.
- Rửa máy hàng ngày sau khi kết thúc quá trình xét nghiệm
- Rửa máy tuần vào 1 ngày cố định trong tuần.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Chạy mẫu QC:
 - + Chạy mẫu QC trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu QC tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
 - + Xem xét kết quả QC:
 - Nếu kết quả QC không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu QC khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - Nếu kết quả QC đạt: Tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả:

Dựa vào tiêu chuẩn đánh giá xét nghiệm định lượng kháng thể kháng NMDA của nhà sản xuất để nhận định kết quả:

 - ✓ Âm tính, dương tính, nghi ngờ.
 - ✓ Đối với mẫu nghi ngờ khuyến cáo kiểm tra lại sau 1 tuần.

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

- Chất lượng của mẫu bệnh phẩm:

- + Huyết thanh vàng
- + Huyết thanh tan máu
- + Huyết thanh đục

Giải pháp: không sử dụng mẫu bị tan máu để làm xét nghiệm; đối với mẫu máu vàng, đục bất thường do bệnh lý cần pha loãng bệnh phẩm để thực hiện lại xét nghiệm.

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..)

Giải pháp: kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào giếng phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Giải pháp:

- + Thực hiện lại quy trình, đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên
- + Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Castro c, gourley m. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J allergy clin immunol. 2010, 125(2 suppl 2):s238-47.

2. kumar y, bhatia a, walker minz r. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagn pathol. 2009 jan 2;4:1.
3. Bossuyt x, de langhe e, borghi mo, meroni pl. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. Nat rev rheumatol. 2020;16(12):715-726.
4. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
5. hovhannes hayrapetyan, thao tran, eglis tellez-corrales, charitha madiraju. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. Methods mol biol. 2023;2612:1-17.

9. GLUTAMATE RECEPTOR (TYPE NMDA) VIÊM NÃO TỰ MIỄN MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các tự kháng thể kháng Glutamate receptor (type NMDA) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán các bệnh viêm não tự miễn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng Glutamate receptor (type NMDA) trong mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đông thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đông
- khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

Bơm tiêm nhựa 5ml

- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để dày kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ

- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 -3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: Dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).
- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 µl kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với

mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.

- Lưu ý: quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.

- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.

- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng $10\mu\text{l}$ dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.

- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.

- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào infected hoặc transfected), 40x (cơ chất tế bào)

- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

- + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân

- + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.

- Xem xét kết quả chứng:

- + Nếu kết quả chứng không đạt:

- ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.

- ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.

- ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.

- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương

pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.

- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiện thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.
- Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)

- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:
 - ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
 - ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu.

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

+ Bình ngâm rửa slide có hóa chất còn sót lại làm sai biệt trong hình ảnh nhuộm.

Giải pháp: Vệ sinh bình sạch sẽ, làm khô sau khi thực hiện xét nghiệm

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật

- Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào vị trí phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

giải pháp:

+ Thực hiện lại quy trình; đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

+ Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

10. GLUTAMATE RECEPTOR (TYPE AMPA1) VIÊM NÃO TỰ MIỄN MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các tự kháng thể kháng Glutamate receptor (type AMPA1) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán các bệnh viêm não tự miễn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng Glutamate receptor (type AMPA1) trong mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đồng thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đong
- Khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.4 Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.5 Vật tư tiêu hao

Bơm tiêm nhựa 5ml

- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để phủ kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.2. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm

- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: Thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 – 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: Dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).

- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 μ l kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.
- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.
- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.
- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng 10 μ l dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.
- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.
- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng mẫu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: Dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.
- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiển thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.
- Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)
- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: Lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

+ Bình ngâm rửa slide có hóa chất còn sót lại làm sai biệt trong hình ảnh nhuộm.

Giải pháp: vệ sinh bình sạch sẽ, làm khô sau khi thực hiện xét nghiệm

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật

- Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào vị trí phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Giải pháp:

+ Thực hiện lại quy trình, đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

+ Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

11. GLUTAMATE RECEPTOR (TYPE AMPA2) VIÊM NÃO TỰ MIỄN MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các tự kháng thể kháng Glutamate receptor (type AMPA2) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán các bệnh viêm não tự miễn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng Glutamate receptor (type AMPA2) trong mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đong
- khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để dày kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang tích gắn camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ

- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: Thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 - 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).
- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 µl kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với

mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.

- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.

- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.

- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng $10\mu\text{l}$ dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.

- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.

- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)

- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

- + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân

- + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.

- Xem xét kết quả chứng:

- + Nếu kết quả chứng không đạt:

- ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.

- ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.

- ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- + Nếu kết quả chứng đạt: Chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.

- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu.

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.

Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa còn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương

pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.

- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiện thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.
- Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)

- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: Chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:
 - ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): Tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
 - ✓ Phản ứng âm tính: Kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bất màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: Kiểm tra thông tin lại trên màn làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: Làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

12. GLUTAMATE RECEPTOR (TYPE AMPA1/2) VIÊM NÃO TỰ MIỄN MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các tự kháng thể kháng Glutamate receptor (type AMPA1/2) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang, hỗ trợ chẩn đoán các bệnh viêm não tự miễn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng Glutamate receptor (type AMPA1/2) trong mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đông thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đông
- khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

Bơm tiêm nhựa 5ml

- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để dày kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm

- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: Thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 - 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).

- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 μ l kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.
- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.
- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.
- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng 10 μ l dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.
- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.
- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: Chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): Tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
- ✓ Phản ứng âm tính: Kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bất màu huỳnh quang không đặc hiệu

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.
- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiển thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.
- Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)
- Bước 6: đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: Kiểm tra thông tin lại trên màn làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: Làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

13. CONTACTIN- ASSOCIATED PROTEIN 2 (CASPR2) VIÊM NÃO TỰ MIỄN MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các tự kháng thể kháng Contactin-associated protein 2 (CASPR2) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán các bệnh viêm não tự miễn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Xét nghiệm phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng Contactin - associated protein 2 (CASPR2) trong mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đong
- khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

Bơm tiêm nhựa 5ml

- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để phủ kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ

- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch:
 - + 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
 - + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Ống máu: Thể tích 3-5ml
 - + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
 - + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 -3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).
- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 µl kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với

mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.

- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.

- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.

- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng $10\mu\text{l}$ dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.

- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.

- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)

- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

- + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân

- + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.

- Xem xét kết quả chứng:

- + Nếu kết quả chứng không đạt:

- ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.

- ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.

- ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.

- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương

pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.

- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiện thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.
- Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)

- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:
 - ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
 - ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: Lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: Kiểm tra thông tin lại trên màn làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: Làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

14. DIPEPTIDYL AMINOPEPTIDASE - LIKE PROTEIN 6 (DPPX)

VIÊM NÃO TỰ MIỄN MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các tự kháng thể kháng Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6 (DPPX) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán các bệnh viêm não tự miễn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6 (DPPX) trong mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đong
- khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

Bơm tiêm nhựa 5ml

- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để phủ kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ

- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: Thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 - 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).
- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 µl kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với

mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.

- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.

- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.

- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng $10\mu\text{l}$ dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.

- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.

- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)

- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

+ Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân

+ Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.

- Xem xét kết quả chứng:

+ Nếu kết quả chứng không đạt:

✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.

✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.

✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

+ Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.

✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: Dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa còn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương

pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.

- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiện thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.

Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)

- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:
 - ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
 - ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: Lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: Kiểm tra thông tin lại trên màn làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: Làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

15. LEUCINE- RICH GLIOMA- INACTIVATED PROTEIN 1 (LGI1) VIÊM NÃO TỰ MIỄN MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các tự kháng thể kháng Leucine-rich glioma-inactivated protein 1 (LGI1) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán các bệnh viêm não tự miễn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng Leucine-rich glioma-inactivated protein 1 (LGI1) trong mẫu bệnh phẩm

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đông thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đông
- khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

Bơm tiêm nhựa 5ml

- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để dày kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ

- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 - 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).
- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 µl kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với

mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.

- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.

- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.

- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng $10\mu\text{l}$ dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.

- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.

- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)

- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

- + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân

- + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.

- Xem xét kết quả chứng:

- + Nếu kết quả chứng không đạt:

- ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.

- ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.

- ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.

- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương

pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.

- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiện thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.

Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)

- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:
 - ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
 - ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: Lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: Kiểm tra thông tin lại trên màn làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: Làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

16. GABAB RECEPTOR (GABARB1/B2) VIÊM NÃO TỰ MIỄN

MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các tự kháng thể kháng GABAB receptor (GABARB1/B2) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán các bệnh viêm não tự miễn.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng GABAB receptor (GABARB1/B2) trong mẫu bệnh phẩm.

2. Chuẩn bị

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đong
- khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

Bơm tiêm nhựa 5ml

- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để phủ kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ

- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 - 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).
- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 µl kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với

mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.

- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.

- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.

- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng $10\mu\text{l}$ dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.

- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.

- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)

- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

- + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân

- + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.

- Xem xét kết quả chứng:

- + Nếu kết quả chứng không đạt:

- ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.

- ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.

- ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.

- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương

pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.

- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiện thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.
- Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)

- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:
 - ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
 - ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bất màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: Lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: Kiểm tra thông tin lại trên màn làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: Làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

17. TỰ KHÁNG THỂ TRONG BỆNH VIÊM NÃO BẰNG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các tự kháng thể trong bệnh viêm não của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán bệnh viêm não.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

- Phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng lại các kháng nguyên thần kinh trong mẫu bệnh phẩm

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đong
- Khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

Bơm tiêm nhựa 5ml

- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để dày kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ

- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: Thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 -3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).
- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 µl kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với

mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.

- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.

- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.

- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng $10\mu\text{l}$ dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.

- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.

- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)

- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

- + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân

- + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.

- Xem xét kết quả chứng:

- + Nếu kết quả chứng không đạt:

- ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.

- ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.

- ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.

- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương

pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.

- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiện thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.
- Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)

- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:
 - ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
 - ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bất màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: Kiểm tra thông tin lại trên màn làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: Làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

18. ĐA TỰ KHÁNG THỂ TRONG BỆNH VIÊM NÃO BẰNG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG (2 LOẠI)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các đa tự kháng thể (AQP4a và MOG) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán các bệnh viêm não.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng lại các kháng nguyên thần kinh (2 loại: AQP4a và MOG) trong mẫu bệnh phẩm

2. Chuẩn bị

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đong
- Khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

Bơm tiêm nhựa 5ml

- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để dày kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ

- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: Thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 - 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).
- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 µl kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với

mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.

- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.

- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.

- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng $10\mu\text{l}$ dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.

- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.

- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)

- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

+ Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân

+ Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.

- Xem xét kết quả chứng:

+ Nếu kết quả chứng không đạt:

✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.

✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.

✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

+ Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu. Ph

✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bất màu huỳnh quang không đặc hiệu

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương

pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.

- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiện thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.

Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)

- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:
 - ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
 - ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bất màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: Lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: Kiểm tra thông tin lại trên màn làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: Làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

19. ĐA TỰ KHÁNG THỂ TRONG BỆNH VIÊM NÃO BẰNG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG (6 LOẠI)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các đa tự kháng thể (Glutamate receptor (type nmda), Contactin- associated protein 2, Glutamate receptor (type AMPA1/2), Leucine-rich glioma-inactivated protein 1, Dipeptidyl aminopeptidase- like protein 6(DPPX), GABAB receptor) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán bệnh viêm não.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phát hiện kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng lại các kháng nguyên thần kinh (6 loại: Glutamate receptor (type NMDA), Contactin- associated protein 2, Glutamate receptor(type AMPA1/2), Leucine-rich glioma-inactivated protein 1, Dipeptidyl aminopeptidase- like protein 6 (DPPX), GABAB receptor) trong mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đồng thủy tinh
- Khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đồng

- Khay hóa chất
- Giá cắm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết dính để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn

Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng

- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để dày kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay

- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode

Máy hút ẩm

- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô

- Tủ âm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: Thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 - 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).

- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 μ l kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.
- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chưa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.
- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.
- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng 10 μ l dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.
- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.
- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.
- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiển thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.
- Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)
- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: Lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: kiểm tra thông tin lại trên miền làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

20. ĐA TỰ KHÁNG THỂ TRONG BỆNH VIÊM MÀNG THẬN NGUYÊN PHÁT BẰNG MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG (2 LOẠI)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các đa tự kháng thể (PLA2R và THSD7A) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán bệnh viêm màng thận nguyên phát.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Xét nghiệm phát hiện các tự kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người liên quan đến bệnh viêm màng thận nguyên phát (2 loại: PLA2R VÀ THSD7A) trong mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đông thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đông
- khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

Bơm tiêm nhựa 5ml

- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để dày kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm

- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: Thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 - 3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. Các bước tiến hành

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miễn phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).
- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút

- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 μ l kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.

- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chứa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.

- Bước 4. Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.

- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng 10 μ l dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.

- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.

- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)

- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

+ Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân

+ Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.

- Xem xét kết quả chứng:

+ Nếu kết quả chứng không đạt:

✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.

✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.

✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

+ Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.

✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bất màu huỳnh quang không đặc hiệu

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính đậy
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy

- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.
- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiển thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.
- Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)
- Bước 6: đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:
 - ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.

✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: kiểm tra thông tin lại trên miền làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

21. TỰ KHÁNG THỂ: GBM (KHÁNG THỂ TRONG HỘI CHỨNG GOODPASTURE'S) BẰNG MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện tự kháng thể GBM (kháng thể trong hội chứng Goodpasture's) của người bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang hỗ trợ chẩn đoán hội chứng Goodpasture.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật huỳnh quang gián tiếp (IIFT) phát hiện phức hợp kháng nguyên - kháng thể dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong đó, mẫu bệnh phẩm đã pha loãng được ủ với chất nền đặc hiệu biểu hiện các kháng nguyên đích. Nếu phản ứng dương tính xảy ra, các kháng thể đặc hiệu IgA, IgG và IgM trong mẫu bệnh phẩm kháng các kháng nguyên đích cần phát hiện sẽ gắn vào các kháng nguyên của chất nền. Để phát hiện sự xuất hiện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể, quá trình ủ lần thứ hai được thực hiện với kháng thể đặc hiệu Anti-IgG (hoặc IgA/ IgM) được đánh dấu FITC và có thể được phát hiện dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phát hiện các tự kháng thể nhóm IgG đặc hiệu của người kháng GBM (kháng thể trong hội chứng Goodpasture's) trong mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Hộp đựng đầu côn
- Ống đong thủy tinh
- khay đựng dụng cụ
- Bình thủy tinh 1 lít pha dung dịch rửa
- Bình đựng ngâm lam
- Cốc đong
- Khay hóa chất
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gắn để phủ kính dày
- Hóa chất nội kiểm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Sinh phẩm tiêu hao cho xét nghiệm
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chuẩn
- Sinh phẩm tiêu hao cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Slide
- Lame kính
- Chất gắn kết để dày kính
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Máy bán tự động

- Kính hiển vi huỳnh quang kèm camera
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.3.2. Máy tự động

- Hệ thống máy miễn dịch huỳnh quang tự động
- Kính hiển vi huỳnh quang tích hợp phần mềm đọc kết quả
- Máy chuẩn bị slide tự động
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Tủ hồ sơ

- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, Heparin.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 -3 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kit hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Ủ 30 µl mẫu đã pha loãng với các slide có gắn chất nền tương ứng. Đảm bảo rằng mỗi mẫu đều liên kết với miền phản ứng có chứa chất nền đặc hiệu của nó và những mẫu riêng lẻ không lẫn vào nhau. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C).
- Bước 2: Xả rửa nhanh các slide với đệm rửa. Sử dụng bình ngâm lam dạng đứng để ngâm ngập các slide với đệm rửa ít nhất 5 phút
- Bước 3: Ủ lần 2 các slide phản ứng với 25 µl kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang: sau khi lấy các slide ra khỏi bình ngâm lam, lau khô phần lưng và cạnh của slide bằng khăn giấy, đập mạnh các cạnh của slide vào khăn giấy với

mục đích loại bỏ phần lớn các dung dịch đệm của quá trình ngâm rửa. Ngay lập tức thực hiện quá trình ủ với kháng thể Anti-IgG đặc hiệu gắn nhãn huỳnh quang trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng ($+18^{\circ}\text{C}$ đến $+25^{\circ}\text{C}$). Kiểm tra tương tác chính xác giữa các vùng phản ứng và hóa chất.

- Lưu ý: Quá trình thực hiện phải nhanh chóng tránh để bề mặt gắn chất nền trên slide bị khô - thực hiện trong vòng 5s. Không chạm vào khu vực phản ứng chứa các chất nền gắn. Kháng thể Anti-IgG người gắn nhãn huỳnh quang nên được trộn đều trước khi dùng. Quá trình ủ cần tránh ánh sáng trực tiếp.

- Bước 4: Bỏ sung đầy dung dịch rửa vào bình ngâm lam. Xối rửa slide bằng đệm rửa sau đó tiếp tục ngâm slide vào đệm rửa trong bình ngâm lam ít nhất 5 phút.

- Bước 5: Chuẩn bị đọc mẫu: nhỏ khoảng $10\mu\text{l}$ dung dịch kết dính lên kính phủ, úp ngược các slide lên kính phủ để chuẩn bị đọc kết quả.

- Bước 6: Đọc bằng kính hiển vi huỳnh quang.

- Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)

- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

- + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân

- + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.

- Xem xét kết quả chứng:

- + Nếu kết quả chứng không đạt:

- ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.

- ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.

- ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.

- + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:

- ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.

- ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, Heparin hoặc Citrat. Dịch não tủy (CSF) đối với một số các xét nghiệm phát hiện tự kháng thể trong bệnh viêm não tự miễn
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các slide đã được phủ mô/ tế bào có biểu hiện kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Các loại chứng bao gồm chứng âm, chứng dương
- Kháng thể kháng IgG người được gắn FITC
- Kít hóa chất (đệm pha loãng mẫu, hóa chất pha dung dịch rửa)
- Chất kết gán để phủ kính dày
- Chuẩn bị dung dịch rửa: dung dịch rửa sau khi được chuẩn bị cần được bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 1 tuần. Lưu ý không sử dụng dung dịch rửa đã bị đục hoặc xuất hiện nhiễm bẩn.
- Pha loãng mẫu bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của bộ xét nghiệm.

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

Thao tác trên máy xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang

- Bước 1: Bật máy, kiểm tra bình thải trống và bình chứa dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy trước khi tiến hành chạy máy. Đặt lọ chứa đệm rửa và lọ chứa cồn 70% vào các kênh hút tương ứng trên máy
- Bước 2: Xây dựng bảng thông tin chạy mẫu “worklist” trên máy: (1) đặt các ống mẫu vào vị trí tương ứng trên máy; (2) tiến hành quét barcode mẫu; (3) chọn phương

pháp tương ứng cho loại xét nghiệm muốn thực hiện; (4) chọn độ pha loãng muốn thực hiện cho từng mẫu; (5) chọn lưu bảng thông tin mẫu “worklist” vừa thiết lập.

- Bước 3: Chọn các vị trí sẽ đặt slide trên phần mềm máy tính, đặt các slide vào vị trí tương ứng trên máy. Số lượng slide phải phù hợp với số lượng mẫu định thực hiện.
- Bước 4: Chọn quét ID của từng slide tương ứng. ID slide sẽ cung cấp thông tin về phương pháp xét nghiệm được sử dụng tương ứng với chất nền trên slide. Kiểm tra kỹ thông tin tương thích với “worklist” đã tạo và vị trí mẫu được hiện thị trước khi tiến hành chạy.
- Bước 5: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.
- Lưu ý: Sau khi kết thúc xét nghiệm cần tiến hành quy trình vệ sinh tự động của máy xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng của máy để loại bỏ hoàn toàn các tác nhân có nguy cơ lây nhiễm và tránh nhiễm chéo kết quả cho lần chạy tiếp theo.
- Đánh giá kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang (đã tích hợp với phần mềm phân tích kết quả)

- Bước 6: Đọc các mẫu thông thường: vật kính 20x (đối với mô, tế bào Infected hoặc Transfected), 40x (cơ chất tế bào)
- Bộ lọc kích thích: 450-490 nm, bộ tách màu: 510 nm, bộ lọc chặn: 515 nm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Chạy chứng dương, chứng âm trước hoặc song song cùng với mẫu xét nghiệm của bệnh nhân
 - + Quy trình chạy mẫu chứng tương tự như quy trình chạy mẫu xét nghiệm.
- Xem xét kết quả chứng:
 - + Nếu kết quả chứng không đạt:
 - ✓ Sử dụng mẫu chứng khác để kiểm tra lần 2.
 - ✓ Nếu kiểm tra lần 2 không đạt yêu cầu thì sử dụng thuốc thử khác của cùng lô sinh phẩm đang sử dụng để kiểm tra lần 3.
 - ✓ Nếu kết quả kiểm tra cả 3 lần đều không đạt yêu cầu thì tạm dừng việc xét nghiệm bằng lô sinh phẩm đang sử dụng, báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm để tìm hiểu nguyên nhân và tìm biện pháp giải quyết. Chỉ tiếp tục thực hiện xét nghiệm sau khi đã hoàn thành việc khắc phục.
 - + Nếu kết quả chứng đạt: chất chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang sáng rõ ràng, đặc hiệu trong khi chứng âm phải cho tín hiệu huỳnh quang âm tính, tiến hành đọc kết quả xét nghiệm và nhận định kết quả. Kết quả được đánh giá bằng kính hiển vi huỳnh quang đã được tích hợp với phần mềm đọc kết quả tự động với:
 - ✓ Phản ứng dương tính (hình ảnh cho tín hiệu huỳnh quang): tự kháng thể phản ứng với kháng nguyên đích trên bề mặt của chất nền tạo tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu.
 - ✓ Phản ứng âm tính: kết quả không cho tín hiệu huỳnh quang hoặc các phản ứng bắt màu huỳnh quang không đặc hiệu

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: Lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị:

+ Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Nguồn sáng, bộ lọc và đơn vị quang học của kính hiển vi huỳnh quang có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp.

Giải pháp: Sử dụng hệ thống hơi thủy ngân truyền thống, sự hoạt động của kính hiển vi sẽ phụ thuộc vào sự bảo trì của thiết bị, đặc biệt là thay thế đèn sau khi hoạt động quá thời gian cho phép.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

- Sai sót do quá trình cài đặt mẫu vào vị trí không tương ứng với vị trí đã cài đặt trên phần mềm

Giải pháp: Kiểm tra thông tin lại trên màn làm việc “work list” về phương pháp, vị trí đặt mẫu, thứ tự các mẫu sau khi đã khai báo

- Xử lý sai các slide trong quá trình nhuộm, đặc biệt để các slide bị khô giữa các bước sẽ dẫn đến “rửa trôi” hình ảnh và/ hoặc hình ảnh nhuộm bị sáng màu.

Giải pháp: Làm lại xét nghiệm, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25°C).

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tebo ae. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin vaccine immunol. 2017 dec 5;24(12):e00270-17.
2. Vercammen m, bonroy c, broeders s, chan ekl, bizzaro n, bogdanos dp, andrade l, coucke w, de melo cruvinel w, kozmar a, kuhi l, lutteri l, rego de sousa mj, schouwens s, van hoovels l, bossuyt x; eflm working group on autoimmunity testing. Analytical aspects of the antinuclear antibody test by hep-2 indirect immunofluorescence: eflm report on an international survey. Clin chem lab med. 2023 mar 30;61(7):1199-1208.
3. Olsen nj, choi my, fritzler mj. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. Arthritis res ther. 2017 jul 24;19(1):172.
4. Mahler m, fritzler mj. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on hep-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin dev immunol. 2012;2012:494356.
5. Ling m, murali m. Antinuclear antibody tests. Clin lab med. 2019 dec;39(4):513-524.
6. Damoiseaux j, andrade lec, carballo og, conrad k, francescantonio plc, fritzler mj, garcia de la torre i, herold m, klotz w, cruvinel wm, mimori t, von muhlen c, satoh m, chan ek. Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: the international consensus on ana patterns (icap) perspective. Ann rheum dis. 2019 jul;78(7):879-889.

22. ĐA TỰ KHÁNG THỂ GANGLIOSIDE TRONG BỆNH THẦN KINH BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ THANH GIẤY

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện các tự kháng thể với Gangliosides được tìm thấy trong mẫu bệnh nhân để hỗ trợ chẩn đoán các bệnh về thần kinh ngoại biên bao gồm: hội chứng Guillain-barre, bệnh viêm đa dây thần kinh hủy Myelin mạn tính, bệnh dây thần kinh vận động đa ổ, bệnh thần kinh cảm giác và hội chứng Miller - fisher.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Thanh giấy có gắn các kháng nguyên tinh khiết được ủ với bệnh phẩm pha loãng, nếu trong bệnh phẩm có chứa các tự kháng thể, các kháng thể đặt hiệu này sẽ gắn với các kháng nguyên tương ứng. Để phát hiện các kháng thể đã gắn, bước ủ thứ hai sẽ được thực hiện với kháng thể gắn enzym đánh dấu, sau đó cơ chất sẽ được thêm vào để xúc tác cho phản ứng tạo màu.

Xét nghiệm phát hiện đa tự kháng thể đặc hiệu nhóm IgM/ IgG của người kháng lại 7 loại Gangliosides (GM1, GM2, GM3, GD1A, GD1B, GT1B, GQ1B trong mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Giá cầm đầu côn
- Giá đựng pipet man
- khay ủ
- Chai thủy tinh nút mài
- Ống đong thủy tinh
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Dung dịch đệm
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm

- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch rửa bệnh phẩm
- Dung dịch rửa máy xét nghiệm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Hcsp chẩn đoán
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu 3ml
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Đầu côn vàng)
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng cá nhân
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy xét nghiệm sắc ký miễn dịch (quy trình máy bán tự động)
- Hệ thống máy xét nghiệm sắc ký miễn dịch tự động (quy trình máy tự động)
- Máy tính
- Máy in

- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Máy lắc
- Máy ủ
- Máy scan
- Máy sấy
- Đồng hồ bấm giờ
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, hoặc Citrat.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết): bệnh phẩm dùng cho phân tích được pha loãng theo hướng dẫn của bộ xét nghiệm với dung dịch đệm. Sử dụng đầu côn sạch trong quá trình thao tác
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 3 - 4 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;
- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định.
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, hoặc Citrat.
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các thanh xét nghiệm đã được phủ kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Chất cộng hợp: kháng thể kháng IgG của người gán Alkaline phosphatase
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch rửa: pha loãng 10 lần dạng cô đặc với nước cất 2 lần, đưa dung dịch về nồng độ hoạt động.

- Dung dịch cơ chất: Nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro- 3-indolylphosphate (nbt/bcip).
- Khay ủ

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Lấy số thanh thử xét nghiệm theo yêu cầu và đặt vào các giếng trống. (đảm bảo bề mặt của thanh thử không bị hư hỏng). Số trên thanh thử phải được nhìn thấy. Ủ thanh xét nghiệm với 1.5ml đệm trên máy lắc ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C) với thời gian tương ứng với hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Sau đó hút sạch.
- Bước 2: Sử dụng đầu côn sạch thêm 1.5ml bệnh phẩm đã được pha loãng ủ với thanh xét nghiệm ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C) trên máy lắc với thời gian tương ứng với hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm.
- Bước 3: Hút sạch dung dịch trong các giếng, rửa với 1.5ml dung dịch đệm rửa trong vòng 5 phút ở nhiệt độ phòng. Quá trình được thực hiện trên máy lắc. Lặp lại bước này 3 lần.
- Bước 4: Thêm 1.5ml kháng thể kháng IgG của người gắn enzyme đã pha loãng về nồng độ hoạt động vào mỗi giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc với thời gian tương ứng với hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm
- Bước 5: Hút sạch dung dịch từ mỗi giếng. Rửa với 1.5ml dung dịch đệm rửa trong vòng 5 phút ở nhiệt độ phòng. Quá trình được thực hiện trên máy lắc. Lặp lại bước này 3 lần.
- Bước 6: Thêm dung dịch cơ chất vào mỗi giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc với thời gian theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm.
- Bước 7: Hút sạch dung dịch từ mỗi giếng. Dùng phản ứng và rửa sạch thanh bằng 1.5ml nước ro hoặc nước cất theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit xét nghiệm. Quy trình được thực hiện trên máy lắc.
- Bước 8: Đặt thanh thử lên giấy, chờ khô và đánh giá kết quả bằng phần mềm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Trên mỗi thanh xét nghiệm đều có một vạch chứng dương đảm bảo tiêu chuẩn chất lượng cho quá trình thực hiện cho từng xét nghiệm. Cần đảm bảo mỗi mẫu bệnh phẩm cho ra kết quả vạch kháng nguyên chứng dương tính mạnh mới được coi là một kết quả đạt. Đối với một kết quả không đạt (vạch chứng không lên hoặc lên yếu) cần được tiến hành tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục nguyên nhân và chạy lại xét nghiệm đó.
 - + Đảm bảo chất lượng xét nghiệm theo quy trình thực hiện nội kiểm
- Đọc kết quả và nhận định kết quả:
 - + Sử dụng phần mềm để đánh giá kết quả.

+ Kết quả được giải thích dựa trên cường độ tín hiệu bao gồm các nhóm sau: Âm tính, dương tính, nghi ngờ (khuyến cáo nên kiểm tra lại xét nghiệm sau 1 tuần với mẫu bệnh phẩm mới).

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, hoặc Citrat.
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các thanh xét nghiệm đã được phủ kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Chất cộng hợp: kháng thể của dê kháng IgG của người gắn alkaline phosphatase
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch rửa: pha loãng 10 lần dạng cô đặc với nước cất 2 lần, đưa dung dịch về nồng độ hoạt động.
- Dung dịch cơ chất: Nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro- 3-indolylphosphate (nbt/bcip).
- khay ủ

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Lấy số thanh thử xét nghiệm theo yêu cầu và đặt vào các giếng trống. (đảm bảo bề mặt của thanh thử không bị hư hỏng). Số trên thanh thử phải được nhìn thấy. Ủ thanh xét nghiệm với 1.5ml đệm trên máy lắc ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C) với thời gian tương ứng với hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Sau đó hút sạch.

- Bước 2: Sử dụng đầu côn sạch thêm 1.5ml bệnh phẩm đã được pha loãng ủ với thanh xét nghiệm ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C) trên máy lắc với thời gian tương ứng với hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm.
- Bước 3: Hút sạch dung dịch trong các giếng, rửa với 1.5ml dung dịch đệm rửa trong vòng 5 phút ở nhiệt độ phòng. Quá trình được thực hiện trên máy lắc. Lặp lại bước này 3 lần.
- Bước 4: Thêm 1.5ml kháng thể kháng IgG của người gắn enzyme đã pha loãng về nồng độ hoạt động vào mỗi giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc với thời gian tương ứng với hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm
- Bước 5: Hút sạch dung dịch từ mỗi giếng. Rửa với 1.5ml dung dịch đệm rửa trong vòng 5 phút ở nhiệt độ phòng. Quá trình được thực hiện trên máy lắc. Lặp lại bước này 3 lần.
- Bước 6: Thêm dung dịch cơ chất vào mỗi giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc với thời gian theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm.
- Bước 7: Hút sạch dung dịch từ mỗi giếng. Dùng phản ứng và rửa sạch thanh bằng 1.5ml nước ro hoặc nước cất theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit xét nghiệm. Quy trình được thực hiện trên máy lắc.
- Bước 8: Đặt thanh thử lên giấy, chờ khô và đánh giá kết quả bằng phần mềm.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Trên mỗi thanh xét nghiệm đều có một vạch chứng dương đảm bảo tiêu chuẩn chất lượng cho quá trình thực hiện cho từng xét nghiệm. Cần đảm bảo mỗi mẫu bệnh phẩm cho ra kết quả vạch kháng nguyên chứng dương tính mạnh mới được coi là một kết quả đạt. Đối với một kết quả không đạt (vạch chứng không lên hoặc lên yếu) cần được tiến hành tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục nguyên nhân và chạy lại xét nghiệm đó.
 - + Đảm bảo chất lượng xét nghiệm theo quy trình thực hiện nội kiểm
- Đọc kết quả và nhận định kết quả:
 - + Sử dụng phần mềm để đánh giá kết quả.
 - + Kết quả được giải thích dựa trên cường độ tín hiệu bao gồm các nhóm sau: âm tính, dương tính, nghi ngờ (khuyến cáo nên kiểm tra lại xét nghiệm sau 1 tuần với mẫu bệnh phẩm mới).

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

- Mẫu bệnh phẩm:
 - + Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: Lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

+ Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi..):

Giải pháp: kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị: Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo quy định.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

+ Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào vị trí phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

+ Quá trình ủ rửa không chính xác

Giải pháp:

+ Thực hiện lại quy trình; đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

+ Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Thanh xét nghiệm không được khô hoàn toàn trước khi đánh giá kết quả dẫn đến những vết bám không đặc hiệu hoặc tín hiệu nền bị cao

Giải pháp: phơi khô hoàn toàn thanh xét nghiệm ở nhiệt độ phòng trước khi tiến hành chụp đánh giá kết quả

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.

- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sun, y., li, z., liang, w. Et al. A novel immunochromatographic strips assay for rapid and simple detection of systemic lupus erythematosus. Sci rep 10, 14178 (2020).

2. S h paek, s h lee, j h cho, y s kim. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. Methods. 2000 sep;22(1):53-60.

3. Alexandr e urusov , alina v petrakova, milyausha k gubaydullina, anatoly v zherdev 1, sergei a eremin 1 2, dezhao kong 3, liqiang liu 3, chuanlai xu 3, boris b dzantiev. High-sensitivity immunochromatographic assay for fumonisin b1 based on indirect antibody labeling. Biotechnol lett. 2017 may;39(5):751-758.
4. Qin q , wang k , yang j , xu h , cao b , wo y , jin q , cui d. Algorithms for immunochromatographic assay: review and impact on future application. Analyst. 2019 sep 23;144(19):5659-5676.

23. ĐA TỰ KHÁNG THỂ TRONG HỘI CHỨNG THẦN KINH CẬN U

BẢNG KỸ THUẬT SẮC KÝ THANH GIẤY

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm được sử dụng để phát hiện đa tự kháng thể với 12 loại kháng nguyên Amphyphisin, CV2, PNMA2, (Ma2/Ta), Ri, Yo, Hu, recoverin, SOX1, titin, Zic4, GAD65, Tr (DNER) trong mẫu bệnh phẩm để chẩn đoán hội chứng thần kinh cận u.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Thanh giấy có gắn các kháng nguyên tinh khiết được ủ với bệnh phẩm pha loãng, nếu trong bệnh phẩm có chứa các tự kháng thể, các kháng thể đặt hiệu này sẽ gắn với các kháng nguyên tương ứng. Để phát hiện các kháng thể đã gắn, bước ủ thứ hai sẽ được thực hiện với kháng thể gắn enzym đánh dấu, sau đó cơ chất sẽ được thêm vào để xúc tác cho phản ứng tạo màu.

Xét nghiệm phát hiện đa tự kháng thể đặc hiệu nhóm IgG của người kháng lại 12 loại kháng nguyên Amphyphisin, CV2, PNMA2, (Ma2/Ta), Ri, Yo, Hu, recoverin, SOX1, titin, Zic4, GAD65, Tr (DNER).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sỹ
- Kỹ thuật y
- Điều dưỡng

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Pipet
- Giá cầm đầu côn
- Giá đựng pipet man
- khay ủ
- Chai thủy tinh nút mài
- Ống đông thủy tinh
- Giá cầm ống nghiệm
- Nhiệt kế, ẩm kế

2.2.2. Hóa chất, thuốc thử

- Dung dịch đệm
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch chất cộng hợp

- Dung dịch cơ chất
- Dung dịch rửa bệnh phẩm
- Dung dịch rửa máy xét nghiệm
- Hóa chất ngoại kiểm
- Hcsp chẩn đoán
- Nước cất 2 lần

2.2.3. Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Kim tiêm nhựa
- Ống đựng máu 3ml
- Ống nghiệm 14x105
- Pipettor thủy tinh
- Đầu côn vàng
- Đầu côn xanh
- Găng lấy mẫu
- Găng tay làm xét nghiệm
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Bông, gạc sát khuẩn, băng urgo
- Khăn giấy lau tay
- Túi nilon đựng rác
- Quần áo nhân viên
- Dung dịch làm sạch, tẩy rửa dụng cụ y tế
- Dung dịch sát khuẩn tay
- Cồn sát khuẩn 70 độ
- Dung dịch xà phòng rửa tay trung tính
- Vật tư thay thế hệ thống điện

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy xét nghiệm sắc ký miễn dịch (quy trình máy bán tự động)
- Hệ thống máy xét nghiệm sắc ký miễn dịch tự động (quy trình máy tự động)
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode

- Máy in barcode
- Máy hút ẩm
- Máy scan
- Máy sấy
- Tủ lạnh lưu mẫu
- Tủ lạnh đựng hóa chất
- Tủ sấy khô
- Tủ ấm 37°C
- Máy ly tâm
- Máy lưu điện
- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- + Loại bệnh phẩm: Máu tĩnh mạch, 01 ống không có chất chống đông hoặc có chất chống đông EDTA, hoặc Citrat.
- + Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết): bệnh phẩm dùng cho phân tích được pha loãng theo hướng dẫn của bộ xét nghiệm với dung dịch đệm. Sử dụng đầu côn sạch trong quá trình thao tác
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
- + Ống máu: thể tích 3-5ml
- + Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- + Trên ống có ghi đầy đủ thông tin: tên, tuổi, khoa, giường hoặc barcode nhận dạng bệnh nhân.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: có 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 ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 3 – 4 giờ

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

3. AN TOÀN

- Mặc trang phục bảo hộ khi làm xét nghiệm;
- Dụng cụ, vật tư tiêu hao sau khi làm xét nghiệm phải cho vào hộp dụng cụ chứa chất thải y tế theo quy định;

- Mẫu bệnh phẩm được lưu và hủy theo quy định;
- Xử lý sự cố tràn đổ theo quy định;
- Vệ sinh sạch sẽ khu vực làm việc trước và sau khi kết thúc buổi làm việc;
- Các điều kiện môi trường phòng xét nghiệm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng ... được theo dõi, giám sát và đảm bảo theo quy định;
- Các trang thiết bị làm xét nghiệm được bảo dưỡng, hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Máy bán tự động

4.1.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, hoặc Citrat.
- Mẫu máu: lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu, máu không bị đục.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các thanh xét nghiệm đã được phủ kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Chất cộng hợp: kháng thể kháng IgG của người gán Alkaline phosphatase (tử dê)
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch rửa: pha loãng 10 lần dạng cô đặc với nước cất 2 lần, đưa dung dịch về nồng độ hoạt động.
- Dung dịch cơ chất: Nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro- 3-indolylphosphate (nbt/bcip).
- Khay ủ

4.1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Lấy số thanh thử xét nghiệm theo yêu cầu và đặt vào các giếng trống. (đảm bảo bề mặt của thanh thử không bị hư hỏng). Số trên thanh thử phải được nhìn thấy. Ủ thanh xét nghiệm với 1.5ml đệm trên máy lắc ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C) với thời gian tương ứng với hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Sau đó hút sạch.
- Bước 2: Sử dụng đầu côn sạch thêm 1.5ml bệnh phẩm đã được pha loãng ủ với thanh xét nghiệm ở nhiệt độ phòng (+18°C đến +25°C) trên máy lắc với thời gian tương ứng với hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm.
- Bước 3: Hút sạch dung dịch trong các giếng, rửa với 1.5ml dung dịch đệm rửa trong vòng 5 phút ở nhiệt độ phòng. Quá trình được thực hiện trên máy lắc. Lặp lại bước này 3 lần.
- Bước 4: Thêm 1.5ml kháng thể kháng IgG của người gắn enzyme đã pha loãng về nồng độ hoạt động vào mỗi giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc với thời gian tương ứng với hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm
- Bước 5: Hút sạch dung dịch từ mỗi giếng. Rửa với 1.5ml dung dịch đệm rửa trong vòng 5 phút ở nhiệt độ phòng. Quá trình được thực hiện trên máy lắc. Lặp lại bước này 3 lần.
- Bước 6: Thêm dung dịch cơ chất vào mỗi giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc với thời gian theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm.
- Bước 7: Hút sạch dung dịch từ mỗi giếng. Dừng phản ứng và rửa sạch thanh bằng 1.5ml nước ro hoặc nước cất theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit xét nghiệm. Quy trình được thực hiện trên máy lắc.
- Bước 8: Đặt thanh thử lên giấy, chờ khô và đánh giá kết quả bằng phần mềm.

4.1.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:
 - + Trên mỗi thanh xét nghiệm đều có một vạch chứng dương đảm bảo tiêu chuẩn chất lượng cho quá trình thực hiện cho từng xét nghiệm. Cần đảm bảo mỗi mẫu bệnh phẩm cho ra kết quả vạch kháng nguyên chứng dương tính mạnh mới được coi là một kết quả đạt. Đối với một kết quả không đạt (vạch chứng không lên hoặc lên yếu) cần được tiến hành tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục nguyên nhân và chạy lại xét nghiệm đó.
 - + Đảm bảo chất lượng xét nghiệm theo quy trình thực hiện nội kiểm
- Đọc kết quả và nhận định kết quả.
- + Sử dụng phần mềm để đánh giá kết quả.
- + Kết quả được giải thích dựa trên cường độ tín hiệu bao gồm các nhóm sau: âm tính, dương tính, nghi ngờ (khuyến cáo nên kiểm tra lại xét nghiệm sau 1 tuần với mẫu bệnh phẩm mới).

4.2. Máy tự động

4.2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: Huyết thanh, huyết tương chống đông bằng EDTA, hoặc Citrat.
- Mẫu máu: Lấy 3ml máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông - ống đựng máu tiêu chuẩn. Máu không vỡ hồng cầu.
- Sau khi lấy máu, đem li tâm tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương cho vào ống tách huyết thanh.
- Mẫu bệnh phẩm phải bảo quản ở 2 - 8°C trong vòng 14 ngày. Mẫu bệnh phẩm đã pha loãng nên được thực hiện trong ngày.
- Pha loãng bệnh phẩm (nếu cần thiết) theo hướng dẫn sử dụng của từng loại xét nghiệm. Chú ý: trộn đều mẫu trước khi tiến hành xét nghiệm.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được lấy đúng tiêu chuẩn và đủ thể tích theo yêu cầu xét nghiệm.
- Các thông tin trên mẫu bệnh phẩm phù hợp với phiếu chỉ định xét nghiệm

4.2.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tất cả các hóa chất của bộ kit xét nghiệm cần được để ổn định ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút trước khi thực hiện thao tác
- Các thanh xét nghiệm đã được phủ kháng nguyên đích và được bảo bản trong một túi thiếc với gói chất chống ẩm
- Dung dịch chất cộng hợp
- Dung dịch pha loãng bệnh phẩm
- Dung dịch rửa: pha loãng theo khuyến cáo của nhà sản xuất
- Dung dịch cơ chất
- khay ủ

4.2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Bước 1: Kiểm tra bình thải phải trống và bình đựng dung dịch rửa hệ thống phải được bổ sung đầy.
- Bước 2: Bật máy, máy tiến hành kiểm tra tự động “selftest” tình trạng của thiết bị trước khi chạy.
- Bước 3: Xây dựng bảng thông tin xét nghiệm thực hiện “worklist” bao gồm: mã bệnh phẩm, thông tin cơ bản của bệnh nhân, mã xét nghiệm thực hiện trên phần mềm tương thích.
- Bước 4: Nạp mẫu vào máy và chuẩn bị hóa chất theo hướng dẫn. Để các lọ đựng hóa chất đã chuẩn bị vào các kênh tương ứng theo hướng dẫn của máy
- Bước 5: Đặt thanh thử vào các giếng trên máy tương ứng với số bệnh phẩm cần thực hiện.
- Bước 6: Chọn chương trình chạy tương ứng.
- Bước 7: Chọn start để máy bắt đầu thực hiện xét nghiệm.

- Lưu ý: Cần tiến hành thực hiện vệ sinh thiết bị theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất trước hoặc sau khi thực hiện xét nghiệm để tránh nhiễm chéo giữa các lần thực hiện

- Bước 8: Đánh giá kết quả bằng phần mềm và in kết quả.

4.2.4. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả chạy chứng:

+ Trên mỗi thanh xét nghiệm đều có một vạch chứng dương đảm bảo tiêu chuẩn chất lượng cho quá trình thực hiện cho từng xét nghiệm. Cần đảm bảo mỗi mẫu bệnh phẩm cho ra kết quả vạch kháng nguyên chứng dương tính mạnh mới được coi là một kết quả đạt. Đối với một kết quả không đạt (vạch chứng không lên hoặc lên yếu) cần được tiến hành tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục nguyên nhân và chạy lại xét nghiệm đó.

+ Đảm bảo chất lượng xét nghiệm theo quy trình thực hiện nội kiểm

- Đọc kết quả và nhận định kết quả

+ Sử dụng phần mềm để đánh giá kết quả

+ Kết quả được giải thích dựa trên cường độ tín hiệu bao gồm các nhóm sau: âm tính, dương tính, nghi ngờ (khuyến cáo nên kiểm tra lại xét nghiệm sau 1 tuần với mẫu bệnh phẩm mới).

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

- Mẫu bệnh phẩm: Máu không được bảo quản đúng cách làm biến tính các tự kháng thể.

Giải pháp: lấy lại mẫu máu. Mẫu máu cần được bảo quản ở 2-8°C, sử dụng trong vòng 14 ngày

- Tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất:

Giải pháp: Xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thuốc thử, hóa chất không đảm bảo chất lượng (hết hạn, hỏng, lỗi...):

Giải pháp: Kiểm tra thuốc thử, hoá chất và thực hiện nội kiểm theo quy định.

- Trang thiết bị: Hoạt động của hệ thống máy phục vụ xét nghiệm không ổn định.

Giải pháp: Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật.

Nhầm lẫn trong nhỏ mẫu vào vị trí phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

- Giải pháp:
- + Thực hiện lại quy trình; đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên
- + Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Thanh xét nghiệm không được khô hoàn toàn trước khi đánh giá kết quả dẫn đến những vết bám không đặc hiệu hoặc tín hiệu nền bị cao

Giải pháp: phơi khô hoàn toàn thanh xét nghiệm ở nhiệt độ phòng trước khi tiến hành chụp đánh giá kết quả

- Đọc, nhận định và phiên giải sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Đào tạo lại và đào tạo liên tục cho nhân viên

- Trả sai kết quả xét nghiệm.

Giải pháp: Quản lý bệnh nhân, chỉ định xét nghiệm và mẫu bệnh phẩm theo mã.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sun, y., li, z., liang, w. Et al. A novel immunochromatographic strips assay for rapid and simple detection of systemic lupus erythematosus. Sci rep 10, 14178 (2020).
2. S h paek, s h lee, j h cho, y s kim. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. Methods. 2000 sep;22(1):53-60.
3. Alexandr e urusov , alina v petrakova, milyausha k gubaydullina, anatoly v zherdev 1, sergei a eremin 1 2, dezhaokong 3, liqiang liu 3, chuanlai xu 3, boris b dzantiev. High-sensitivity immunochromatographic assay for fumonisin b1 based on indirect antibody labeling. Biotechnol lett. 2017 may;39(5):751-758.
4. Qin q , wang k , yang j , xu h , cao b , wo y , jin q , cui d. Algorithms for immunochromatographic assay: review and impact on future application. Analyst. 2019 sep 23;144(19):5659-5676.

24. TIÊM HOẶC TRUYỀN CÁC CHẾ PHẨM SINH HỌC

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Định nghĩa, nguyên lý

Tiêm truyền các chế phẩm sinh học đường tĩnh mạch là đưa vào cơ thể người bệnh một khối lượng dung dịch và thuốc bằng đường tĩnh mạch

1.2. Mục đích của kỹ thuật

Truyền các chế phẩm sinh học được dùng để điều trị các bệnh lý dị ứng, bệnh tự miễn và ung thư rất có hiệu quả nhưng giá thành cao và cũng có thể có các tác dụng phụ trước mắt và lâu dài nên chỉ dùng cho những trường hợp bệnh nặng.

2. CHỈ ĐỊNH

- Được chỉ định để điều trị nhiều loại bệnh tự miễn dịch trong các trường hợp nặng không đáp ứng với các thuốc điều trị thông thường. Mỗi loại chế phẩm sinh học sẽ có các chỉ định riêng.

- Một số bệnh lý dị ứng, bệnh tự miễn và bệnh lý viêm có thể được chỉ định điều trị các chế phẩm sinh học bao gồm:

- + Viêm khớp dạng thấp
- + viêm cột sống dính khớp
- + Bệnh Crohn
- + Viêm loét đại trực tràng
- + Vảy nến
- + Xơ cứng rải rác
- + Lupus ban đỏ hệ thống
- + Hen phế quản dị ứng
- + Mày đay mạn tính
- + Giảm tiểu cầu miễn dịch vô căn không đáp ứng với Corticoid
- + Người bệnh viêm cơ tự miễn có tổn thương phổi kẽ hoặc có viêm mạch nặng, hoặc đáp ứng kém với Corticoid phối hợp với Metrothexate.
- + Hội chứng Guillain-barre
- + Viêm đa rễ thần kinh mất Myelin
- + Bệnh Kawasaki
- + Hội chứng Stevens-Johnson và hội chứng Lyell do thuốc
- + Suy giảm miễn dịch dịch thể

3. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Mỗi loại chế phẩm sinh học sẽ có các chống chỉ định riêng biệt, dưới đây là một số chống chỉ định thường gặp:

- Phụ nữ có thai
- Suy tim nặng
- Mẫn cảm với các thành phần của thuốc

4. THẬN TRỌNG

- Tiền sử mắc Lao
- Phụ nữ đang cho con bú

5. CHUẨN BỊ

5.1. Người thực hiện

- Bác sỹ: 01 người
- Điều dưỡng: 01 người

5.2. Thuốc, hóa chất

- Methylprednisolon 40 mg
- Dopamin 200 mg
- Morphin 0,1% - 2ml
- Epinephrine 1mg
- Diphenhydramin hydrochloride 10 mg
- Salbutamol 5 mg kd
- Salbutamol 0,5 mg
- Glucose 5% 500ml
- Natriclorid 0,9% 100ml
- Natriclorid 0,9% 500ml
- Thuốc chống nôn, thuốc lợi tiểu

5.3. Vật tư

5.3.1 Dụng cụ

- Kéo, băng dính
- Huyết áp, ống nghe
- Gối kê tay, dây garo, cọc truyền
- Hộp vô khuẩn đựng: gạc tam giác, gạc phủ vùng truyền, bông cầu
- Găng tay vô khuẩn
- khay quả đậu hoặc túi đựng đồ bẩn, hộp đựng vật sắc nhọn
- Xe tiêm chuyên dụng

- Lồng kính pha thuốc chuyên dụng
- Quần áo, mũ, găng, kính bảo hộ để pha thuốc

5.3.2 Vật tư tiêu hao

- Dung dịch khử khuẩn tẩy rửa
- Dung dịch khử khuẩn tay chứa cồn
- Dung dịch khử khuẩn
- Cồn sát khuẩn 70 °C
- Bơm tiêm nhựa 1ml
- Bơm tiêm nhựa 5ml
- Bơm tiêm nhựa 10ml
- Bơm tiêm nhựa 20ml
- Bơm tiêm nhựa 50ml
- Dây truyền huyết thanh
- Điện cực dán cho máy theo dõi người bệnh
- Kim luồn Catheter
- Chạc ba dịch truyền có dây nối
- Gạc lót đốc kim 4cmx5cmx4l
- Băng dính y tế
- Băng keo cá nhân 2cm x 6cm
- Canuyn mayo
- Găng khám
- Mũ giấy
- Khẩu trang giấy dây buộc
- Bông hút
- Oxy
- Dây oxy
- Dây nối bơm tiêm điện
- Mask khí dung

5.4. Trang thiết bị

- Máy theo dõi dấu hiệu sinh tồn
- Máy tính
- Máy in
- Đầu đọc barcode
- Máy in barcode

- Thùng đựng rác tái chế
- Thùng đựng rác lây nhiễm
- Thùng đựng rác sinh hoạt
- Thùng nhựa ngâm dụng cụ bẩn....

5.5. Chuẩn bị bệnh nhân

- Bác sỹ giải thích cho người bệnh liệu pháp điều trị, sự cần thiết, hiệu quả và các tác dụng không mong muốn có thể có.
- Người bệnh đồng ý tham gia liệu pháp điều trị.
- Động viên và dặn người bệnh đi đại tiện trước khi truyền.

5.6. Hồ sơ bệnh án

- Kiểm tra y lệnh, thực hiện 5 đúng
- Kiểm tra lại xét nghiệm, đánh giá chức năng thận, tình trạng của người bệnh.

5.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 1-2 giờ

5.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Buồng bệnh

5.9. Kiểm tra hồ sơ

a. *Kiểm tra người bệnh:* đánh giá tính chính xác của người bệnh: đúng người bệnh, đúng chẩn đoán, đúng vị trí cần thực hiện thủ thuật.

b. *Thực hiện bảng kiểm an toàn thủ thuật*

c. *Tư thế bệnh nhân:* nằm

6. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

6.1. Các bước thực hiện

- Điều dưỡng rửa tay đội mũ, đeo khẩu trang, mặc quần áo, đi găng bảo hộ
- Kiểm tra chai dịch, thuốc và bật nút chai, sát khuẩn tiến hành pha thuốc trong lồng kính chuyên dụng
- Xé túi đựng dây truyền, khóa dây truyền, cắm dây truyền vào chai dịch, treo chai dịch lên cọc truyền, đuổi hết khí trong dây truyền và khóa lại.
- Điều dưỡng thay găng, đặt người bệnh nằm tư thế thuận lợi, bộc lộ vùng truyền, xác định vị trí truyền
- Đặt gối dưới vùng truyền, nẹp (nếu cần), đặt dây garo trên vị trí truyền
- Thắt dây garo, sát khuẩn vị trí truyền 2 lần bằng cồn 70 °C.
- 1 tay cố định tĩnh mạch nơi truyền, 1 tay cầm kim catheter đâm qua da một góc 15 độ đến 30 độ, hạ kim tiêm sát mặt da và luồn kim vào tĩnh mạch, khi thấy máu vào đốc kim tháo dây garo,
- Lắp ba chạc, dây truyền,
- Mở khóa cho dịch chảy, quan sát sắc mặt người bệnh.

- Cố định đốc kim, đặt gạc phủ vùng truyền, cố định dây truyền, điều chỉnh tốc độ nhỏ giọt theo chỉ định. Bỏ nilon, gối kê tay và dây garo
- Tiêm thuốc chống nôn cho người bệnh
- Truyền cho người bệnh chai dịch có pha chế phẩm sinh học với tốc độ 60 giọt/phút
- Tiêm thuốc lợi tiểu cho người bệnh
- Ghi phiếu tiêm truyền:
 - + Giờ bắt đầu truyền
 - + Số lượng dịch truyền
 - + Giờ kết thúc
- Dẫn người bệnh những điều cần thiết trước khi rời phòng
- Theo dõi sát tình trạng người bệnh

6.2. Nhận định kết quả

- Trong 15 phút đầu theo dõi người bệnh về sắc mặt, mạch, huyết áp, nhịp thở, vùng truyền. Nếu thấy những biểu hiện bất thường phải báo ngay cho bác sĩ biết
- Quan sát sự lưu thông của dịch
- Chai dịch pha chế phẩm sinh học luôn được bảo quản tránh ánh sáng mặt trời và truyền nhanh 60giọt/ phút
- Thường xuyên kiểm tra:
 - + Xem nơi truyền có sưng phồng không
 - + Dịch chảy có bị tắc không
 - + Không khí có trong dây truyền hay không
 - + Có bị tuột dây truyền ra khỏi đốc kim không
 - + Khi còn khoảng 10-15 ml dịch thì khóa lại, rút kim truyền hoặc thay chai khác nếu truyền tiếp
- Đánh giá lại tình trạng người bệnh qua xét nghiệm: tế bào máu, điện giải đồ, sau truyền lần đầu 3-5 ngày và sau 2 tuần nếu điều trị lâu dài
- Theo dõi tình trạng viêm, chảy máu của đường tiết niệu. Nếu có đái máu đại thể cần ngừng trị liệu.

6.3. 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.

7. THEO DÕI VÀ XỬ TRÍ TAI BIẾN

7.1. Tai biến trong khi thực hiện kỹ thuật

- Dịch không chảy:
 - + Do mũi vát của thành kim áp sát vào thành mạch

- + Do mạch xếp
- + Do tắc kim thường do cục máu đông trong lòng mạch

Giải pháp: kiểm tra nguyên nhân và điều chỉnh kim truyền, dây truyền cho phù hợp.

- Phòng nơi tiêm do kim truyền bị chệch khỏi lòng mạch, dịch thoát ra ngoài gây phỏng nơi truyền làm cho người bệnh đau, gây hoại tử tổ chức nếu dịch truyền là ưu trương, hóa chất...

Giải pháp: Kiểm tra nguyên nhân và cầm lại đường truyền cho phù hợp.

- Người bệnh bị sốc: trong quá trình truyền dung dịch tĩnh mạch, người bệnh có thể bị sốc do phản ứng với thuốc, hoặc dịch truyền không đảm bảo. Sốc cũng có thể xảy ra nếu lượng dịch đi vào cơ thể người bệnh quá nhanh với số lượng lớn.

Giải pháp: ngừng truyền, cấp cứu bệnh nhân theo phác đồ cấp cứu sốc phản vệ của bộ y tế.

- Phù phổi cấp: trong trường hợp người bệnh bị bệnh tim, phổi, khi truyền dịch với số lượng lớn, tốc độ nhanh có thể dẫn đến phù phổi cấp nguy hiểm tính mạng người bệnh.

Giải pháp: ngừng truyền, thăm khám điều trị.

- Tắc mạch phổi: truyền dung dịch tĩnh mạch cho người bệnh nếu không đúng qui trình kỹ thuật, không khí lọt vào trong lòng mạch gây tắc ở những vùng mạch nhỏ, não, phổi...

Giải pháp: ngừng truyền, thăm khám điều trị.

7.2. Tai biến sau khi thực hiện kỹ thuật

- Bệnh nhân có biểu hiện dị ứng cấp tính - sốc phản vệ

Giải pháp: Cấp cứu bệnh nhân theo phác đồ cấp cứu sốc phản vệ của Bộ y tế.

- Bệnh nhân có biểu hiện: ban đỏ trên da, mào đay, phù, ngứa...

Giải pháp: Thăm khám, đánh giá mức độ dị ứng của bệnh nhân và chỉ định thuốc điều trị.

7.3. Biến chứng muộn

- Bệnh nhân có biểu hiện dị ứng muộn

Giải pháp: Thăm khám, đánh giá mức độ dị ứng của bệnh nhân và chỉ định thuốc điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. White b, moore wc, wigley fm, et al. Cyclophosphamide is associated with pulmonary function and survival benefit in patients with scleroderma and alveolitis. Ann intern med. 2000;132:947-54.
2. Teles ka, medeiros-souza p, lima fac, Araújo bg, lima rac. Cyclophosphamide administration routine in autoimmune rheumatic diseases: a review. Rev bras reumatol engl ed. 2017 nov-dec;57(6):596-604.

3. Dan d, fischer r, adler s, förger f, villiger pm. Cyclophosphamide: as bad as its reputation? Long-term single centre experience of cyclophosphamide side effects in the treatment of systemic autoimmune diseases. *Swiss med wkly*. 2014 oct 23;144:w14030.
4. Woytala pj, morgiel e, łuczak a, czesak-woytala k, wiland p. The safety of intravenous cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases. *Adv clin exp med*. 2016 may-jun;25(3):479-84.
5. Mehra s, usdadiya jb, jain vk, misra dp, negi vs. Comparing the efficacy of low-dose vs high-dose cyclophosphamide regimen as induction therapy in the treatment of proliferative lupus nephritis: a single center study. *Rheumatol int*. 2018 apr;38(4):557-568.
6. Crispin p, burgess m, beath a. Unified infusion rates for 10% intravenous immunoglobulin. *Transfus apher sci*. 2018 apr;57(2):243-246.
7. Sriaroon p, ballow m. Immunoglobulin replacement therapy for primary immunodeficiency. *immunol allergy clin north am*. 2015 nov;35(4):713-30.
8. Paul f, cartron g. infusion-related reactions to rituximab: frequency, mechanisms and predictors. *Expert rev clin immunol*. 2019 apr;15(4):383-389.