

BỘ Y TẾ

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

Số: 6769 /QĐ-BYT

Hà Nội, ngày 08 tháng 11 năm 2018

QUYẾT ĐỊNH

Về việc ban hành tài liệu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh

BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

Căn cứ Luật khám bệnh, chữa bệnh năm 2009;

Căn cứ Nghị định 75/2017/NĐ-CP ngày 20 tháng 6 năm 2017 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Y tế;

Xét Biên bản họp ngày 05 tháng 9 năm 2018 của Hội đồng nghiệm thu Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh của Bộ Y tế;

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 “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh”, gồm 83 quy trình kỹ thuật.

Điều 2. Tài liệu “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh” ban hành kèm theo Quyết định này được áp dụng tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh.

Căn cứ vào tài liệu hướng dẫn này và điều kiện cụ thể của đơn vị, Giám đốc cơ sở khám bệnh, chữa bệnh xây dựng và ban hành tài liệu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh phù hợp để thực hiện tại đơn vị.

Điều 3. Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày ký ban hành.

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

Nơi nhận:

- Như Điều 4;
- Bộ trưởng Bộ Y tế (để b/c);
- Các Thứ trưởng BHYT;
- Bảo hiểm Xã hội Việt Nam (để phối hợp);
- Công thông tin điện tử BHYT;
- Website Cục QLKCB;
- Lưu VT, KCB.

KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG

Đã ký

Nguyễn Việt Tiến

**DANH SÁCH 83 HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT
CHUYÊN NGÀNH VI SINH***(Ban hành kèm theo Quyết định số 6769/QĐ-BYT ngày 08 tháng 11 năm 2018
của Bộ trưởng Bộ Y tế)*

| TT | TÊN QUY TRÌNH KỸ THUẬT |
|-----|--------------------------------------------------------------------------|
| 1. | Vi khuẩn vi hiếu khí nuôi cấy và định danh bằng phương pháp thông thường |
| 2. | MTB IGRA (Interferon γ Asay) |
| 3. | NTM (Nontuberculous mycobacteria) định danh Real-time PCR |
| 4. | <i>Vibrio cholerae</i> soi tươi |
| 5. | <i>Vibrio cholerae</i> Real-time PCR |
| 6. | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Real-time PCR |
| 7. | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> kháng thuốc PCR |
| 8. | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> kháng thuốc giải trình tự gene |
| 9. | <i>Chlamydia</i> kháng thuốc giải trình tự gene |
| 10. | <i>Clostridium difficile</i> miễn dịch tự động |
| 11. | <i>Helicobacter pylori</i> Ag test nhanh |
| 12. | <i>Helicobacter pylori</i> Ab test nhanh |
| 13. | <i>Helicobacter pylori</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc |
| 14. | <i>Helicobacter pylori</i> Ab miễn dịch bán tự động |
| 15. | <i>Helicobacter pylori</i> Real-time PCR |
| 16. | <i>Leptospira</i> định danh PCR |
| 17. | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Ab miễn dịch bán tự động |
| 18. | <i>Mycoplasma hominis</i> test nhanh |
| 19. | <i>Mycoplasma hominis</i> nhuộm huỳnh quang |
| 20. | <i>Mycoplasma hominis</i> PCR |
| 21. | <i>Mycoplasma hominis</i> Real-time PCR |
| 22. | <i>Rickettsia</i> Real-time PCR |
| 23. | <i>Treponema pallidum</i> nhuộm huỳnh quang |
| 24. | <i>Treponema pallidum</i> test nhanh |
| 25. | <i>Treponema pallidum</i> PCR |
| 26. | <i>Treponema pallidum</i> Real-time PCR |
| 27. | <i>Ureaplasma urealyticum</i> test nhanh |
| 28. | <i>Ureaplasma urealyticum</i> nhuộm huỳnh quang |
| 29. | <i>Ureaplasma urealyticum</i> PCR |
| 30. | <i>Ureaplasma urealyticum</i> Real-time PCR |

| | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|
| 31. | Virus Ag miễn dịch tự động |
| 32. | Virus Ab miễn dịch tự động |
| 33. | Virus Xpert |
| 34. | Virus PCR |
| 35. | Virus Real-time PCR |
| 36. | Virus giải trình tự gen |
| 37. | HBsAb test nhanh |
| 38. | HBcAb test nhanh |
| 39. | HBeAg test nhanh |
| 40. | HBeAb test nhanh |
| 41. | HBeAg định lượng |
| 42. | HAV Ab test nhanh |
| 43. | HCV Ab test nhanh |
| 44. | HEV IgG miễn dịch bán tự động |
| 45. | Dengue virus IgA test nhanh |
| 46. | Dengue virus NS1Ag miễn dịch bán tự động |
| 47. | Dengue virus Real-time RT-PCR |
| 48. | HSV 2 IgG miễn dịch tự động |
| 49. | EBV IgG miễn dịch tự động |
| 50. | EV71 IgM/IgG test nhanh |
| 51. | BK virus đo tải lượng Real-time PCR |
| 52. | Enterovirus Real-time PCR |
| 53. | Coronavirus Real-time PCR |
| 54. | Hantan virus test nhanh |
| 55. | Hantavirus PCR |
| 56. | MEASLES VIRUS Ab MIỄN DỊCH TỰ ĐỘNG |
| 57. | Rota virus Ag miễn dịch bán tự động |
| 58. | Rotavirus PCR |
| 59. | Rubella virus test nhanh |
| 60. | Rubella virus Avidity |
| 61. | Rubellavirus Real-time PCR |
| 62. | Zika virus Real-time PCR |
| 63. | Parvovirus B19 IgM miễn dịch bán tự động |
| 64. | Parvovirus B19 IgG miễn dịch bán tự động |
| 65. | Parvo virus B19 Real-time PCR |
| 66. | Chikungunia IgM miễn dịch bán tự động |
| 67. | Cryptosporidium test nhanh |
| 68. | <i>Echinococcus granulosus</i> (Sán dây chó) Ab miễn dịch bán tự động |
| 69. | <i>Paragonimus</i> (Sán lá phổi) Ab miễn dịch bán tự động |

| | |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 70. | <i>Schistosoma</i> (Sán máng) Ab miễn dịch bán tự động |
| 71. | <i>Toxoplasma gondii</i> IgM miễn dịch bán tự động |
| 72. | <i>Toxoplasma gondii</i> IgG miễn dịch bán tự động |
| 73. | <i>Trichinella spiralis</i> (Giun xoắn) Ab miễn dịch bán tự động |
| 74. | Định danh vi sinh vật bằng kỹ thuật PCR lồng đa tác nhân |
| 75. | Vi sinh vật nhiễm khuẩn não-màng não Real-time PCR đa tác nhân |
| 76. | Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp Real-time PCR đa tác nhân |
| 77. | Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường ruột Real-time PCR đa tác nhân |
| 78. | MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) định danh TRCReady |
| 79. | MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) kháng INH nồng độ cao môi trường lỏng |
| 80. | MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) định danh TB-LAMP |
| 81. | MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) kháng thuốc MIC trên môi trường lỏng |
| 82. | MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) kháng thuốc Bedaquiline MIC trên môi trường thạch |
| 83. | <i>Norovirus</i> test nhanh |

**KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG**

Đã ký

Nguyễn Viết Tiến

BỘ Y TẾ

**HƯỚNG DẪN
QUY TRÌNH KỸ THUẬT
CHUYÊN NGÀNH VI SINH Y HỌC
(Tập 2)**

Hà Nội 2018

MỤC LỤC

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Vi khuẩn vi hiếu khí nuôi cấy và định danh bằng phương pháp thông thường | 1 |
| 2. MTB IGRA (Interferon γ Assay) | 4 |
| 3. NTM (Nontuberculous mycobacteria) định danh Real-time PCR..... | 8 |
| 4. <i>Vibrio cholerae</i> soi tươi | 12 |
| 5. <i>Vibrio cholerae</i> real-time PCR | 15 |
| 6. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Real-time PCR | 18 |
| 7. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> kháng thuốc PCR..... | 22 |
| 8. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> kháng thuốc giải trình tự gene..... | 25 |
| 9. <i>Chlamydia</i> kháng thuốc giải trình tự gene | 28 |
| 10. <i>Clostridium difficile</i> miễn dịch tự động..... | 31 |
| 11. <i>Helicobacter pylori</i> Ag test nhanh..... | 35 |
| 12. <i>Helicobacter pylori</i> Ab test nhanh | 38 |
| 13. <i>Helicobacter pylori</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc | 41 |
| 14. <i>Helicobacter pylori</i> Ab miễn dịch bán tự động..... | 46 |
| 15. <i>Helicobacter pylori</i> Real-time PCR | 50 |
| 16. <i>Leptospira</i> định danh PCR..... | 53 |
| 17. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Ab miễn dịch bán tự động | 56 |
| 18. <i>Mycoplasma hominis</i> test nhanh..... | 60 |
| 19. <i>Mycoplasma hominis</i> nhuộm huỳnh quang | 63 |
| 20. <i>Mycoplasma hominis</i> PCR..... | 66 |
| 21. <i>Mycoplasma hominis</i> Real-time PCR | 70 |
| 22. <i>Rickettsia</i> Real-time PCR..... | 73 |
| 23. <i>Treponema pallidum</i> nhuộm huỳnh quang..... | 77 |
| 24. <i>Treponema pallidum</i> test nhanh..... | 80 |
| 25. <i>Treponema pallidum</i> PCR..... | 83 |
| 26. <i>Treponema pallidum</i> Real-time PCR | 86 |
| 27. <i>Ureaplasma urealyticum</i> test nhanh..... | 89 |
| 28. <i>Ureaplasma urealyticum</i> nhuộm huỳnh quang | 92 |
| 29. <i>Ureaplasma urealyticum</i> PCR..... | 95 |
| 30. <i>Ureaplasma urealyticum</i> Real-time PCR | 99 |
| 31. Virus Ag miễn dịch tự động..... | 103 |
| 32. Virus Ab miễn dịch tự động..... | 108 |

| | |
|---------------------------------------------------|-----|
| 33. Virus Xpert..... | 113 |
| 34. Virus PCR..... | 116 |
| 35. Virus Real-time PCR..... | 119 |
| 36. Virus giải trình tự gen..... | 123 |
| 37. HBsAb test nhanh..... | 126 |
| 38. HBcAb test nhanh..... | 129 |
| 39. HBeAg test nhanh..... | 132 |
| 40. HBeAb test nhanh..... | 135 |
| 41. HBeAg định lượng..... | 138 |
| 42. HAV Ab test nhanh..... | 143 |
| 43. HCV Ab test nhanh..... | 146 |
| 44. HEV IgG miễn dịch bán tự động..... | 149 |
| 45. Dengue virus IgA test nhanh..... | 153 |
| 46. Dengue virus NS1Ag miễn dịch bán tự động..... | 156 |
| 47. Dengue Virus Real-time RT-PCR..... | 160 |
| 48. HSV 2 IgG miễn dịch tự động..... | 164 |
| 49. EBV IgG miễn dịch tự động..... | 167 |
| 50. EV71 IgM/IgG test nhanh..... | 170 |
| 51. BK virus đo tải lượng Real-time PCR..... | 173 |
| 52. Enterovirus Real-time PCR..... | 177 |
| 53. Coronavirus Real-time PCR..... | 181 |
| 54. Hantan virus test nhanh..... | 185 |
| 55. Hantavirus PCR..... | 188 |
| 56. Measles virus Ab miễn dịch tự động..... | 191 |
| 57. Rota virus Ag miễn dịch bán tự động..... | 195 |
| 58. Rotavirus PCR..... | 199 |
| 59. Rubella virus test nhanh..... | 203 |
| 60. Rubella virus Avidity..... | 206 |
| 61. Rubellavirus Real-time PCR..... | 210 |
| 62. Zika virus Real-time PCR..... | 214 |
| 63. Parvovirus B19 IgM miễn dịch bán tự động..... | 218 |
| 64. Parvovirus B19 IgG miễn dịch bán tự động..... | 222 |
| 65. Parvo virus B19 Real-time PCR..... | 226 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 66. Chikungunia IgM miễn dịch bán tự động | 231 |
| 67. Cryptosporidium test nhanh | 235 |
| 68. <i>Echinococcus granulosus</i> (Sán dây chó) Ab miễn dịch bán tự động..... | 238 |
| 69. <i>Paragonimus</i> (Sán lá phổi) Ab miễn dịch bán tự động..... | 241 |
| 70. <i>Schistosoma</i> (Sán máng) Ab miễn dịch bán tự động | 244 |
| 71. <i>Toxoplasma gondii</i> IgM miễn dịch bán tự động..... | 247 |
| 72. <i>Toxoplasma gondii</i> IgG miễn dịch bán tự động | 252 |
| 73. <i>Trichinella spiralis</i> (Giun xoắn) Ab miễn dịch bán tự động..... | 256 |
| 74. Định danh vi sinh vật bằng kỹ thuật PCR lồng đa tác nhân..... | 259 |
| 75. Vi sinh vật nhiễm khuẩn não-màng não Real-time PCR đa tác nhân | 262 |
| 76. Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp Real-time PCR đa tác nhân..... | 265 |
| 77. Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường ruột Real-time PCR đa tác nhân | 268 |
| 78. MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) định danh TRCReady | 271 |
| 79. MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) kháng INH nồng độ cao môi trường lỏng..... | 275 |
| 80. MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) định danh TB-LAMP | 279 |
| 81. MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) kháng thuốc MIC trên môi trường lỏng..... | 283 |
| 82. MTB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) kháng thuốc Bedaquiline MIC trên môi trường thạch | 287 |
| 83. <i>Norovirus</i> test nhanh..... | 292 |

PHỤ LỤC:

CÁC TỪ VIẾT TẮT

| | |
|-----------|-------------------------------------------------|
| BCDN: | Bạch cầu đa nhân |
| CLIA: | Chemiluminescence immunoassay |
| CLSI: | Clinical and laboratory standards institute |
| CO: | Cut off |
| DNA: | Deoxyribonucleic acid |
| ELISA: | Enzyme-linked immunosorbant assay |
| EQAS: | External quality assessment scheme |
| HBV: | Hepatitis B virus |
| HCV: | Hepatitis C virus |
| HIV: | Human immunodeficiency virus |
| HPC: | High positive control |
| HT: | Huyết thanh |
| I: | Intermediate |
| IU: | International unit |
| KKT: | Kháng kháng thể |
| KN-KT: | Kháng nguyên - Kháng thể |
| KST: | Ký sinh trùng |
| LPC: | Low positive control |
| NC: | Negative control |
| OD: | Optical density |
| PC: | Positive control |
| PCR: | Polymerase chain reaction |
| QC: | Quality control |
| R: | Resistant |
| RNA: | Ribonucleic acid |
| RT – PCR: | Reverse transcription polymerase chain reaction |
| S: | Susceptible |
| VD: | Ví dụ |
| VK: | Vi khuẩn |
| VSV: | Vi sinh vật |

1. Vi khuẩn vi hiếu khí nuôi cấy và định danh bằng phương pháp thông thường

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện và định danh vi khuẩn vi hiếu khí gây bệnh bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển.

2. Nguyên lý

Dựa vào đặc điểm về hình dạng, tính chất bắt màu của vi khuẩn khi nhuộm Gram, đặc điểm của khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy, điều kiện khí trường cần cho nuôi cấy và các thử nghiệm sinh vật hóa học để xác định vi khuẩn.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1 Trang thiết bị:

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ ấm thường, tủ ấm CO₂
- Kính hiển vi
- Lò hấp
- Máy đo độ đục chuẩn
- Máy tính cài phần mềm đọc API (nếu có)
- Hộp nuôi cấy kín

2.2 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Môi trường vận chuyển bệnh phẩm | lọ |
| 2 | Môi trường nuôi cấy vi hiếu khí | đĩa |
| 3 | Túi Genbag vi hiếu khí | túi |
| 4 | Bộ định danh API | bộ |
| 5 | Dung dịch Oxydase | ml |

| | | |
|----|-----------------------------------------------|-----|
| 6 | Thuốc nhuộm tím Gentian | ml |
| 7 | Lugol | ml |
| 8 | Cồn tẩy màu 95 ⁰ | ml |
| 9 | Thuốc nhuộm đỏ Fucsin | ml |
| 10 | Dầu soi kính | ml |
| 11 | Cồn 70 ⁰ lau tủ an toàn sinh học | ml |
| 12 | Đầu côn 200 μ l vô trùng | cái |
| 13 | Lam kính | cái |
| 14 | Que cấy nhựa vô trùng | cái |
| 15 | Tube plastic 5 ml vô trùng | cái |
| 16 | Khay đựng bệnh phẩm | cái |
| 17 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | cái |
| 18 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 19 | A xít ngậm lam | ml |
| 20 | Mũ bảo hộ | cái |
| 21 | Khẩu trang | cái |
| 22 | Găng tay | đôi |
| 23 | Giấy lau bề mặt tủ an toàn | tờ |
| 24 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 25 | Găng xử lý dụng cụ | đôi |
| 26 | Bút viết kính | cái |
| 27 | Bút bi | cái |
| 28 | Túi đựng rác | cái |
| 29 | Áo phòng xét nghiệm | cái |
| 30 | Sổ xét nghiệm | tờ |
| 31 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | tờ |
| 32 | Nội kiểm tra chất lượng (QC)* (nếu thực hiện) | |
| 33 | Ngoại kiểm tra (EQAS)* (nếu thực hiện) | |

* Ghi chú:

- Chi phí nội kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình nội kiểm (QC) là 1/10 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lượng ≥ 10 mẫu cho 1 lần tiến hành kỹ thuật).

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 4 lần/1 năm).

3 Bệnh phẩm

Tất cả bệnh phẩm được chỉ định nuôi cấy tìm vi khuẩn vi hiếu khí.

4 Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh.

2. Tiến hành kỹ thuật

- Nhuộm soi bệnh phẩm, đánh giá sơ bộ
- Cấy bệnh phẩm trên môi trường nuôi cấy
- Ủ ấm trong điều kiện khí trường tối ưu phù hợp, ở nhiệt độ thích hợp và trong thời gian phù hợp với tùy loại căn nguyên cần tìm kiếm.
- Lấy khuẩn lạc nghi ngờ nhuộm Gram, thử tính chất sinh vật hóa học đơn giản, định danh bằng bộ API.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Dựa kết quả nhuộm Gram, đặc điểm khuẩn lạc và đặc điểm sinh vật hóa học của vi khuẩn để nhận định kết quả.

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả tên vi khuẩn gây bệnh đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn gây bệnh

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Quy trình này chỉ áp dụng cho nuôi cấy và định danh tìm vi khuẩn vi hiếu khí trong các loại bệnh phẩm.
- Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm, mà chỉ khẳng định là không tìm thấy vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.
- Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng yêu cầu có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

2. MTB IGRA (Interferon γ Assay)

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xét nghiệm hỗ trợ phát hiện nhiễm *M. tuberculosis* thông qua việc phát hiện interferon γ (IFN- γ) bằng kỹ thuật ELISA.

2. Nguyên lý

Phát hiện interferon γ do các tế bào miễn dịch tạo ra khi bị kích thích bởi các mycobacterial peptides (ESAT-6, CFP-10 và TB7.7(p4)) dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành xét nghiệm.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành xét nghiệm.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ ấm thường
- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Máy lắc phiến nhựa
- Máy Vortex
- Máy đọc phiến nhựa ở bước sóng 450 nm và 620 – 650 nm
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l.
- Bộ micropipette 8 kênh thể tích từ 50 μ l đến 200 μ l

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | mL |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |

| | | |
|----|----------------------------------------------------|------|
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm chất lượng | Test |
| 11 | Chứng ngoại kiểm âm (nếu có) | MI |
| 12 | Chứng ngoại kiểm dương (nếu có) | MI |
| 13 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu có)* | |
| 14 | Nước cất | MI |
| 15 | Đầu côn 1000 µl | Cái |
| 16 | Đầu côn 200 µl | Cái |
| 17 | Giấy thấm | Cuộn |
| 18 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 19 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 20 | Bút viết kính | Cái |
| 21 | Bút bi | Cái |
| 22 | Mũ | Cái |
| 23 | Khẩu trang | Cái |
| 24 | Găng tay | Đôi |
| 25 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 26 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 27 | Dung dịch xà phòng rửa tay | MI |
| 28 | Cồn sát trùng tay nhanh | MI |
| 29 | Dung dịch khử trùng | MI |
| 30 | Khăn lau tay | Cái |

* Ghi chú: Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 4 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Máu toàn phần 4 ml lấy vào 4 ống, mỗi ống 1 ml theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

- Lấy 1mL máu ở tĩnh mạch vào trong mỗi ống QFT (4 ống).
- Sau khi lấy máu xong, lập tức lắc các ống khoảng 10 lần vừa đủ mạnh để đảm bảo toàn bộ bề mặt bên trong của ống được phủ máu (để hòa tan) toàn bộ các kháng nguyên trên thành ống.
- Chuyển các ống tới phòng xét nghiệm ở nhiệt độ 17 – 27°C.
- Máu phải được ủ ấm ở nhiệt độ 37°C càng sớm càng tốt (và trong vòng 16 giờ sau khi lấy máu)

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm QuantiFERON®-TB Gold (QFT®) plus (VD hoặc bộ sinh phẩm tương đương)

| Các bước | Nội dung |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.1 | Máu phải được ủ ấm càng sớm càng tốt (trong vòng 16 giờ sau khi lấy máu) Ủ ấm các ống ở vị trí đặt thẳng đứng ở 37°C trong 16 – 24 giờ. Không cần điều kiện độ ẩm/CO2. |
| 2.2 | Ly tâm các tube 2000–3000g (RCF) trong thời gian 15 phút. |
| 2.3 | Tách huyết tương <ul style="list-style-type: none">- Các mẫu Huyết tương nên chỉ được thu bằng pipette- Các mẫu huyết tương có thể được lấy trực tiếp từ các ống QFT đã ly tâm vào các giếng ELISA, bao gồm cả khi sử dụng dàn ELISA tự động.- Các mẫu huyết tương đã tách có thể được bảo quản trong 28 ngày ở nhiệt độ 2–8°C, dưới –20°C trong thời gian dài hơn. |
| 2.4 | Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự. |
| 2.5 | Chuẩn bị hóa chất ELISA Hiệu chỉnh Lọ Standard và Conjugate |
| 2.6 | Vẽ sơ đồ thực hiện |
| 2.7 | Chuẩn bị dung dịch Standard và dung dịch Working Strength |
| 2.8 | Chuẩn bị số Trip trên đĩa ELISA đủ cho số lượng mẫu |
| 2.9 | Lấy 50µL dung dịch working strength vào mỗi giếng ELISA Lấy 50µL huyết tương vào các giếng ELISA mẫu (trừ các giếng S1,S2,S3,S4) Lấy 50µL dung dịch S1, S2, S3, S4 theo thứ tự đã ghi ở sơ đồ |
| 2.10 | Lắc đĩa trong thời gian 1 phút Ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 2 giờ (Cần bọc đĩa ELISA để tránh tiếp xúc ánh sáng trực tiếp). |
| 2.11 | Chuẩn bị dịch rửa |

| | |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.12 | Hút 100μL dung dịch Substrate vào mỗi giếng Phủ kín và ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút Cho tiếp 50μL dung dịch stopping solution vào mỗi giếng và lắc |
| 2.13 | Đo OD ở bước sóng 450nm và tham chiếu ở bước sóng 620nm trong vòng 5 phút khi dừng phản ứng |
| 2.14 | Sử dụng phần mềm QFT 2.7.1 để phân tích kết quả |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Xác nhận kết quả khi:

- Giá trị trung bình OD cho Standard 1 phải $\geq 0,600$
- %CV của các giá trị lặp lại của Standard 1 và Standard 2 phải $\leq 15\%$
- Các giá trị OD lặp lại của Standard 3 và Standard 4 phải không sai khác qua 0,040 đơn vị OD so với giá trị trung bình của nó.
- Hệ số tương quan tính từ các giá trị trung bình của các Standards phải $\geq 0,98$.

4. Diễn giải kết quả

| Nil (IU/mL) (1) | Hiệu số TB1 Ag- Nil (IU/mL) (2) | Hiệu số TB2 Ag- Nil (IU/mL) | Hiệu số Mitogen -Nil (IU/mL) (3) | Kết quả QuantiFERON Plus | Giải thích | |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| ≤ 8.0 | <0.35 | <0.35 | ≥ 0.5 | Âm tính | Kết quả cho biết không nhiễm Lao | |
| | ≥ 0.35 & < 25% Nil | ≥ 0.35 & < 25% Nil | ≥ 0.5 | | | |
| | ≥ 0.35 & $\geq 25\%$ Nil | Bất kỳ | Bất kỳ | Dương tính | Kết quả cho biết tình trạng nhiễm Lao | |
| | Bất kỳ | ≥ 0.35 & $\geq 25\%$ Nil | | | | |
| | > 8 | < 0.35 | <0.35 | < 0.5 | Không xác định | Kết quả không xác định cho biết không có phản ứng với kháng nguyên Lao |
| | | ≥ 0.35 & < 25% Nil | ≥ 0.35 & < 25% Nil | < 0.5 | | |
| > 8 | Bất kỳ | Bất kỳ | Bất kỳ | | | |

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

Kết quả không xác định hoặc không tin cậy có thể do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Mẫu từ lúc lấy đến lúc được ủ ở 37°C lâu hơn 16 tiếng.
- Lượng interferon γ quá nhiều heterophile antibody.

2. Xử trí

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

3. NTM (Nontuberculous mycobacteria) định danh Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định DNA đặc trưng của NTM (Nontuberculous mycobacteria) trong mẫu bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy real-time PCR đa màu và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm lạnh
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ $5\ \mu\text{l}$ - $1000\ \mu\text{l}$.
- Đầu côn có phin lọc các thể tích từ $5\ \mu\text{l}$ - $1000\ \mu\text{l}$.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------|--------|
| 1. | Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng | Cái |
| 2. | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 3. | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 4. | Găng không có bột tal (DNase-RNase free) | Đôi |
| 5. | Sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho chẩn đoán | Test |

| | | |
|-----|---------------------------------------------------------------------------|------|
| 6. | Khẩu hao sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 7. | Hóa chất và vật tư tiêu hao cho tách acid nucleic | Test |
| 8. | Tube eppendorff 1,5 ml | Cái |
| 9. | Strip 8 tubes 0,1 ml | Cái |
| 10. | Nắp đậy strip 8 tubes | Cái |
| 11. | Đầu côn có phin lọc 1 ml | Cái |
| 12. | Đầu côn có phin lọc 200 µl | Cái |
| 13. | Đầu côn có phin lọc 10 µl | Cái |
| 14. | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 15. | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16. | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17. | Bút viết kính | Cái |
| 18. | Bút bi | Cái |
| 19. | Mũ | Cái |
| 20. | Khẩu trang | Cái |
| 21. | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 22. | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 23. | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 24. | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 25. | Dung dịch khử trùng | ml |
| 26. | Khăn lau tay | Cái |
| 27. | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Đờm, các dịch sinh học (dịch phế quản, dịch não tủy, nước tiểu, phân...), mảnh sinh thiết...

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh.

2. Tiến hành kỹ thuật

Các bộ sinh phẩm (VD hoặc tương đương):

- ExiPrep™ Dx Mycobacteria Genomic DNA Kit (Bioneer).
- Accupower MTB & NTM Real-time PCR Kit (Bioneer)

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết DNA (nếu cần).

2.2. Tách chiết DNA, RNA

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh

- Cài đặt chương trình cho máy real-time PCR trước khi pha hóa chất.
- Chuẩn bị Master Mix
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube Master Mix.
- Cài đặt vị trí mẫu trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn các kênh màu phù hợp với từng tác nhân của mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang tuyến tính vượt quá tín hiệu nền và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang cho chứng nội dương tính hoặc thẳng và không vượt qua tín hiệu nền (đường biểu diễn âm tính).
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang chứng nội dương tính

2. Phân tích mẫu

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng tương ứng với màu FAM và máy báo DETECTED.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính và máy báo NON-DETECTED

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- 1. Sự cố:** Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.
 - 2. Nguyên nhân:** Có thể mẫu âm thực sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.
- Khắc phục: Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

4. *Vibrio cholerae* soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Nhận định đặc điểm di động đặc trưng của *V. cholerae* trong bệnh phẩm phân hoặc từ huyền dịch vi khuẩn.

2. Nguyên lý

Tính chất di động nhanh như tên bắn là đặc điểm đặc trưng của *V. cholerae*. Dựa vào đặc điểm di động này để có thể nhận định sơ bộ sự có mặt của *V. cholerae* trong phân hoặc trong huyền dịch vi khuẩn.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Nhân viên có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

Kính hiển vi quang học

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|---------------------------------------|--------|
| 1 | Lọ lấy bệnh phẩm | Lọ |
| 2 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Lam kính | Cái |
| 4 | Nước muối sinh lý | ml |
| 5 | Cồn 96 ⁰ lau kính | ml |
| 6 | Lamen | Cái |
| 7 | Que cấy | Cái |
| 8 | Bôcan | Cái |
| 12 | Dung dịch khử khuẩn | ml |
| 13 | Cồn 90 ⁰ (vệ sinh dụng cụ) | ml |
| 14 | Đèn cồn | Cái |
| 15 | Panh | Cái |
| 16 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|-----------------------------|-----|
| 17 | Mũ | Cái |
| 18 | Khẩu trang | Cái |
| 19 | Găng tay | Đôi |
| 20 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 21 | Quần áo | Bộ |
| 22 | A xít ngâm lam | ml |
| 23 | Ống nghiệm thủy tinh | Ống |
| 24 | Bút viết kính | Cái |
| 25 | Bút bi | Cái |
| 26 | Bật lửa | Cái |
| 27 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 28 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 29 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 30 | Khăn lau tay | Cái |
| 31 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | Tờ |

3. Bệnh phẩm

Phân lỏng.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị một lam kính sạch, lấy một hoặc vài loop dịch nuôi cấy hoặc phân lỏng chuyển vào giữa lam kính.
- Đậy lamên lên trên huyền dịch vi khuẩn hoặc giọt phân lỏng trên lam kính.
- Soi ở vật kính x10 và x40 để quan sát sự di động của vi khuẩn.
- Vứt bỏ lam soi vào bình chứa dung dịch sát khuẩn.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trực khuẩn di động như tên bản là kết quả nghi ngờ sự có mặt của *V. cholerae*.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5. *Vibrio cholerae* real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của *Vibrio cholerae* trong mẫu bệnh phẩm phân của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1 Trang thiết bị

- Tủ an toàn Sinh học cấp 2
- Máy Real-time PCR
- Máy in màu
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Pipette

2.2 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|---------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Lọ lấy bệnh phẩm | Lọ |
| 2 | Panh | Cái |
| 3 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Hộp vận chuyên bệnh phẩm | Test |
| 5 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 6 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Cái |
| 7 | Sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho chẩn đoán | Test |
| 8 | Khẩu hao sinh phẩm cho chẩn đoán và kiểm tra chất lượng | Test |
| 9 | Kit tách chiết DNA | Test |
| 10 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 11 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |

| | | |
|----|----------------------------|------|
| 12 | Đầu côn 10 ul có lọc | Cái |
| 13 | Đầu côn 30 ul | Cái |
| 14 | Đầu côn 200 ul có lọc | Cái |
| 15 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 16 | Ethanol BDH | ml |
| 17 | Water-DEPC Treated | ml |
| 18 | Giấy thấm | Cuộn |
| 19 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 20 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 21 | Bút viết kính | Cái |
| 22 | Bút bi | Cái |
| 23 | Mũ | Cái |
| 24 | Khẩu trang | Cái |
| 25 | Găng tay | Đôi |
| 26 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 27 | Quần áo | Bộ |
| 28 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 29 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 30 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 31 | Khăn lau tay | cái |
| 32 | Ngoại kiểm (nếu có)* | |

* Ghi chú: Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3 Bệnh phẩm

Bệnh phẩm phân

4 Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1 Tách chiết DNA tổng số

2.2 Thực hiện Real-time PCR

2.3 Phân tích và đánh giá kết quả

2.4 In và trả kết quả

3. Thời gian thực hiện: 4 tiếng

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản, chứng âm không có bất kỳ đường đồ thị huỳnh quang nào xuất hiện. Đường đồ thị huỳnh quang của mẫu có thể xuất hiện hoặc không xuất hiện trên đường giới hạn cơ bản, căn cứ vào đó để kết luận kết quả.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Trong trường hợp positive control (PC) và negative (NC) xuất hiện không đúng với diễn giải ở phần IV thì phải kiểm tra lại Master mix , chứng dương và quá trình tách DNA tổng số, và thực hiện lại toàn bộ xét nghiệm.

- Nếu đường đồ thị huỳnh quang của mẫu xuất hiện ở ngoài chu kỳ thứ 40 thì phải cẩn thận kiểm tra và đánh giá lại mẫu.

6. *Neisseria gonorrhoeae* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích:

Xác định sự có mặt của *Neisseria gonorrhoeae* trong bệnh phẩm dịch niệu đạo, cổ tử cung hoặc dịch cơ thể có nghi ngờ có căn nguyên *N. gonorrhoeae*.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy Real-time PCR
- Ống Eppendorf 1,5 ml hoặc 2 ml
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Đầu côn có màng lọc 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|---------------------------------------------------------------------------|--------|
| 3 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 5 | Ống nhựa Ependoff 1.5ml | ống |
| 6 | Sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho chẩn đoán | Test |
| 7 | Khẩu hao sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 8 | Hóa chất và vật tư tiêu hao cho tách acid nucleic | Test |
| 9 | Tube eppendorff 1,5 ml | Cái |
| 10 | Strip 8 tubes 0,1 ml | Cái |
| 11 | Nắp đậy strip 8 tubes | Cái |
| 12 | Đầu côn có phin lọc 1 ml | Cái |
| 13 | Đầu côn có phin lọc 200 µl | Cái |
| 14 | Đầu côn có phin lọc 10 µl | Cái |
| 15 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 16 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 18 | Bút viết kính | Cái |
| 19 | Bút bi | Cái |
| 20 | Mũ | Cái |
| 21 | Khẩu trang | Cái |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú: Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch niệu đạo, cổ tử cung hoặc dịch cơ thể có nghi ngờ có căn nguyên *N. gonorrhoeae*.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật: VD bộ sinh phẩm chẩn đoán LightPower CHT/NGN rPCR Plus (hoặc sinh phẩm tương đương)

2.1 Tách chiết DNA theo hướng dẫn sử dụng của Kit tách chiết DNA.

2.2 Thực hiện phản ứng Real-time PCR.

2.3 Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Bước 1: Kiểm tra nguy cơ ngoại nhiễm

- Chọn chứng (+) và chứng (-) và phân tích trên kênh màu FAM và HEX
- Kết quả chứng (-) không có đường tín hiệu khuếch đại với kênh màu FAM: mẫu không bị ngoại nhiễm. Vì vậy có thể đọc kết quả mẫu chứng (+) và mẫu.
- Kết quả chứng (-) có đường tín hiệu khuếch đại với kênh màu FAM: mẫu bị ngoại nhiễm, phải tiến hành tách chiết DNA lại.

Bước 2: Kiểm tra độ nhạy

- Chọn chứng (+) và chứng (-) và phân tích trên kênh màu FAM và HEX
- Kết quả chứng (-) có đường tín hiệu khuếch đại với kênh màu HEX: PCR không bị ức chế.
- Kết quả chứng (-) không có đường tín hiệu khuếch đại hoặc tín hiệu thấp với kênh màu HEX, PCR bị ức chế toàn phần hay một phần, tách chiết DNA lại hoặc pha loãng DNA trước khi chạy PCR.

Bước 3: Xác định mẫu dương tính *Neisseria gonorrhoeae*

- Chọn từng mẫu, chứng (+) và chứng (-) và phân tích trên kênh màu FAM
- Mẫu có tín hiệu huỳnh quang với kênh màu FAM và có Ct: là những mẫu dương tính *Neisseria gonorrhoeae*
- Các mẫu có Ct <12 và tín hiệu huỳnh quang không tăng theo chu kỳ nhiệt: pha loãng DNA mẫu với tỉ lệ 1/5 trước khi cho vào PCR master mix

Bước 4: Xác định mẫu âm tính *Neisseria gonorrhoeae*

- Chọn từng mẫu, chứng (+) và chứng (-) và phân tích trên kênh màu FAM và HEX
- Mẫu không có tín hiệu khuếch đại với màu FAM và dương tính với màu HEX, thì kết quả là mẫu âm tính với *Neisseria gonorrhoeae*
- Nếu mẫu có tín hiệu khuếch đại với màu FAM nhưng không có Ct và dương tính với màu HEX, thì kết quả là *Neisseria gonorrhoeae* trong bệnh phẩm dưới

ngưỡng phát hiện

- Nếu mẫu không có tín hiệu khuếch đại với màu FAM và âm tính với màu HEX, thì mẫu bị ức chế cần tiến hành lại PCR với DNA đã pha loãng hoặc tách chiết lại. Nếu kết quả vẫn như cũ thì phải lấy lại mẫu bệnh phẩm làm xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường
- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế
- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật.

7. *Neisseria gonorrhoeae* kháng thuốc PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gene kháng thuốc của *Neisseria gonorrhoeae* trong mẫu bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

Phương tiện, hóa chất như ví dụ dưới đây hoặc tương đương.

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy PCR
- Bộ lưu điện
- Ống Eppendorf 1,5 ml hoặc 2 ml
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Đầu côn có màng lọc 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 5 | Ống nhựa Ependoff 1.5ml | ống |
| 6 | Sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho chẩn đoán | Test |
| 7 | Khấu hao sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 8 | Hóa chất và vật tư tiêu hao cho tách acid nucleic | Test |
| 9 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 10 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 11 | Đầu côn 10 ul có lọc | Cái |
| 12 | Đầu côn 30 ul | Cái |
| 13 | Đầu côn 200 ul có lọc | Cái |
| 14 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 15 | Ethanol BDH | ml |
| 16 | Water-DEPC Treated | ml |
| 17 | Thạch | Gram |
| 18 | Ladder | ml |
| 19 | Blue Juice Gel loading dye | ml |
| 20 | Ethidium Bromide (Redgel) | ml |
| 21 | TAE Buffer | ml |
| 22 | Giấy thấm | Cuộn |
| 23 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 24 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 25 | Bút viết kính | Cái |
| 26 | Bút bi | Cái |
| 27 | Mũ | Cái |
| 28 | Khẩu trang | Cái |
| 29 | Găng tay | Đôi |
| 30 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|------------------------------------|--------|
| 31 | Quần áo | Bộ |
| 32 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 33 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 34 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 35 | Khăn lau tay | cái |
| 36 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch niệu đạo, cổ tử cung hoặc chủng vi khuẩn lậu.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Tách chiết DNA tổng số
- Thực hiện PCR
- Điện di kiểm tra sản phẩm
- Đánh giá và kết luận

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Sản phẩm PCR phải có một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét, không bị đứt gãy và có kích thước tương ứng với đoạn gene đích cần khuếch đại.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Khi kết quả khi chứng âm và/hoặc chứng dương không hợp lý, cần phải kiểm tra lại quá trình tách chiết DNA tổng số, chất lượng primers và master mix, sau đó thực hiện lại xét nghiệm.

8. *Neisseria gonorrhoeae* kháng thuốc giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự thay đổi trình tự nucleotide trên hệ gene của *Neisseria gonorrhoeae* có liên quan đến khả năng kháng thuốc.

2. Nguyên lý

Dựa trên trình tự nucleotide đặc trưng của gene mã hóa cho đặc tính kháng thuốc của vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự gene.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học)..
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- **Máy ly tâm 25000 x g**
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy PCR
- Máy giải trình tự gene
- Bộ lưu điện
- Ống Eppendorf 1,5 ml hoặc 2 ml
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Đầu côn có màng lọc 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|---------------------------------------------------------|---------------|
| 1 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 2 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Que |
| 3 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 4 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 5 | Khẩu hao sinh phẩm cho chẩn đoán và kiểm tra chất lượng | Test |
| 6 | Kit tách chiết DNA/RNA | Test |
| 7 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 8 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 9 | Đầu côn 10 ul có lọc | Cái |
| 10 | Đầu côn 30 ul | Cái |
| 11 | Đầu côn 200 ul có lọc | Cái |
| 12 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 13 | Ethanol BDH | MI |
| 14 | Water-DEPC Treated | MI |
| 15 | Thạch | Gram |
| 16 | Ladder | ml |
| 17 | Blue Juice Gel loading dye | ml |
| 18 | Ethidium Bromide (Redgel) | ml |
| 19 | TAE Buffer | ml |
| 20 | Giấy thấm | Cuộn |
| 21 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 22 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 23 | Bút viết kính | Cái |
| 24 | Bút bi | Cái |
| 25 | Mũ | Cái |
| 26 | Khẩu trang | Cái |
| 27 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 28 | Quần áo | Bộ |
| 29 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 30 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 31 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 32 | Khăn lau tay | cái |
| 33 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch niệu đạo, cổ tử cung hoặc chùng vi khuẩn lậu.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Tách chiết DNA tổng số
- Thực hiện PCR gene kháng thuốc
- Điện di kiểm tra sản phẩm
- Giải trình tự gene
- Kiểm tra sự thay đổi nucleotide của gene kháng thuốc và kết luận

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Sản phẩm PCR phải có một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét và không bị đứt gãy. Trình tự DNA của gene đích được so sánh với các trình tự của gene của chủng hoang dại trên “Genebank” để xác định sự có mặt hoặc không có mặt của các đột biến kháng thuốc đã được biết.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Trong trường hợp không có sản phẩm PCR, cần phải kiểm tra lại quá trình tách chiết DNA tổng số, chất lượng primers và master mix, và thực hiện lại.
- Nếu trình tự DNA bị nhiễu cần phải kiểm tra lại độ đặc hiệu của sản phẩm PCR hoặc quá trình chạy PCR sequencing bị nhiễm chéo.

9. *Chlamydia* kháng thuốc giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự thay đổi trình tự nucleotide trên hệ gene của *Chlamydia* có liên quan đến khả năng kháng thuốc.

2. Nguyên lý

Dựa trên trình tự nucleotide đặc trưng của gene mã hóa cho đặc tính kháng thuốc của vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự gene.

II. CHUẨN BỊ

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học tối thiểu cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- **Máy ly tâm 25000 x g**
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy PCR
- Máy giải trình tự gene
- Bộ lưu điện
- Ống Eppendorf 1,5 ml hoặc 2 ml
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Đầu côn có màng lọc 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Giấy xét nghiệm | Tờ |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|---------------------------------------------------------|---------------|
| 2 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Que |
| 3 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 4 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 5 | Khẩu hao sinh phẩm cho chẩn đoán và kiểm tra chất lượng | Test |
| 6 | Kit tách chiết DNA/RNA | Test |
| 7 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 8 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 9 | Đầu côn 10 ul có lọc | Cái |
| 10 | Đầu côn 30 ul | Cái |
| 11 | Đầu côn 200 ul có lọc | Cái |
| 12 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 13 | Ethanol BDH | MI |
| 14 | Water-DEPC Treated | MI |
| 15 | Thạch | Gram |
| 16 | Ladder | MI |
| 17 | Blue Juice Gel loading dye | MI |
| 18 | Ethidium Bromide (Redgel) | MI |
| 19 | TAE Buffer | MI |
| 20 | Giấy thấm | Cuộn |
| 21 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 22 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 23 | Bút viết kính | Cái |
| 24 | Bút bi | Cái |
| 25 | Mũ | Cái |
| 26 | Khẩu trang | Cái |
| 27 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 28 | Quần áo | Bộ |
| 29 | Dung dịch xà phòng rửa tay | MI |
| 30 | Cồn sát trùng tay nhanh | MI |
| 31 | Dung dịch khử trùng | MI |
| 32 | Khăn lau tay | Cái |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|------------------------------------|--------|
| 33 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch cơ thể nghi ngờ có căn nguyên do *Chlamydia trachomatis* gây bệnh.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Tách chiết DNA tổng số
- Thực hiện PCR gene kháng thuốc
- Điện di kiểm tra sản phẩm
- Giải trình tự gene
- Kiểm tra sự thay đổi nucleotide của gene kháng thuốc và kết luận

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Sản phẩm PCR phải có một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét và không bị đứt gãy. Trình tự DNA của gene đích được so sánh với các trình tự của gene của chủng hoang dại trên “Genebank” để xác định sự có mặt hoặc không có mặt của các đột biến kháng thuốc đã được biết.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Trong trường hợp không có sản phẩm PCR, cần phải kiểm tra lại quá trình tách chiết DNA tổng số, chất lượng primers và master mix, và thực hiện lại.
- Nếu trình tự DNA bị nhiễu cần phải kiểm tra lại độ đặc hiệu của sản phẩm PCR hoặc quá trình chạy PCR sequencing bị nhiễm chéo.

10. *Clostridium difficile* miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện toxin A và toxin B của *Clostridium difficile* trực tiếp từ bệnh phẩm phân.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELFA (Enzyme-linked Fluorescent Assay) (Ví dụ).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Dàn máy ELFA (Vidas) hoặc tương đương.
- Máy ly tốc độ ≥ 12000 gpm/phút
- Tủ lạnh 2^oC -8^oC
- Micropipette 200 μ l và 1000 μ l.
- Giá đựng ống tube eppendorf

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Lọ đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Ống ly tâm bằng polypropylen thể tích 1,5 - 2 ml | Cái |
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán* | Test |
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Chứng ngoại kiểm âm (nếu có) | MI |
| 8 | Chứng ngoại kiểm dương (nếu có) | MI |
| 9 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

| | | |
|----|----------------------------|------|
| 10 | Nước cất | MI |
| 11 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 12 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 13 | Giấy thấm | Cuộn |
| 14 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Bút viết kính | Cái |
| 17 | Bút bi | Cái |
| 18 | Mũ | Cái |
| 19 | Khẩu trang | Cái |
| 20 | Găng tay không bột | Đôi |
| 21 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 22 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 23 | Dung dịch xà phòng rửa tay | MI |
| 24 | Cồn sát trùng tay nhanh | MI |
| 25 | Dung dịch khử trùng | MI |
| 26 | Khăn lau tay | Cái |

* Ghi chú:

- Sinh phẩm chẩn đoán chạy mỗi lần bao gồm sinh phẩm chạy cho mẫu và chạy cho chứng âm, chứng dương toxin A, chứng dương toxin B và chất chuẩn.

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Tối thiểu 3 ml phân lỏng, tốt nhất là 10 – 20 ml phân đựng trong lọ vô trùng có nắp xoáy. Nếu phân nát, lấy khoảng 3 g phân đựng trong lọ vô trùng có nắp xoáy.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm VIDAS® C. difficile Toxin A & B (Biomerieux) (VD hoặc tương đương)

| Các bước tiến hành | Nội dung |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 1 | Chuẩn bị sinh phẩm |
| 2 | Chuẩn bị mẫu phân Chuẩn bị chất chuẩn và các chứng |
| 3 | Nhỏ chứng và bệnh phẩm theo thứ tự hướng dẫn |
| 4 | Đưa kít vào máy chạy theo hướng dẫn |
| 5 | Quá trình thực hiện hoàn toàn tự động trên máy trong vòng 75 phút |
| 6 | Đọc kết quả |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện

Các giá trị của chứng phải nằm trong khoảng giới hạn chấp nhận.

2. Nhận định, trả lời kết quả

- Nhận định kết quả qua phân tích của máy dựa trên cơ sở hướng dẫn của bộ kít.
- Nếu kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm sau lần xét nghiệm đầu tiên 15 - 20 ngày.

$$\text{Giá trị của mẫu} = \frac{\text{RFV mẫu}}{\text{RFV standard}} \quad \text{RFV} = \text{Relative Fluorescence Value}$$

Kết quả

| Giá trị mẫu | Kết quả |
|-------------------|---------------|
| < 0.13 | Âm tính |
| ≥ 0.13 đến < 0.37 | Không rõ ràng |
| ≥ 0.37 | Dương tính |

Nếu kết quả không rõ ràng, làm lại xét nghiệm từ mẫu phân ban đầu hoặc lấy mẫu phân mới. Nếu kết quả vẫn không rõ ràng thì nên xét nghiệm bằng phương pháp khác.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ: VIDAS® C. difficile Toxin A & B (Biomerieux) (VD)

- Các hóa chất pha loãng mà không phải hóa chất pha loãng mẫu từ kit VIDAS *C. difficile* Toxin A & B thì không được sử dụng cho xét nghiệm VIDAS *C. difficile* Toxin A & B.
- Phân của trẻ mới sinh có gây nhiễu xét nghiệm VIDAS *C. difficile* Toxin A & B – không xét nghiệm với các bệnh phẩm từ trẻ nhỏ hơn 2 tuổi.
- Các bệnh phẩm là phân mà chứa nhiều chất béo không được đánh giá. Tránh lấy mẫu này trong xét nghiệm VIDAS *C. difficile* Toxin A & B
- Do mẫu không đồng nhất, việc trộn kỹ bệnh phẩm là phân là rất cần thiết để tránh các kết quả không thống nhất. Các mẫu cho kết quả trái ngược với các thông tin lâm sàng phải được xét nghiệm lại sử dụng mẫu mới
- Hàm lượng độc tố có thể khác nhau từ một bệnh phẩm của Người bệnh.
- Một kết quả âm tính của xét nghiệm VIDAS *C. difficile* Toxin A & B riêng lẻ có thể bác bỏ khả năng viêm đại tràng hoặc tiêu chảy liên quan đến *C. difficile*. Việc này có thể do kết quả lấy mẫu không đúng hoặc bảo quản bệnh phẩm không đúng. Luôn luôn đánh giá các kết quả xét nghiệm VIDAS *C. difficile* Toxin A & B cùng với các dấu hiệu lâm sàng và tiền sử bệnh của Người bệnh khi chẩn đoán các bệnh liên quan đến *C. difficile*.
- Một kết quả xét nghiệm dương tính riêng lẻ của xét nghiệm VIDAS *C. difficile* Toxin A & B có thể không được sử dụng để chẩn đoán viêm đại tràng và tiêu chảy liên quan đến *C. difficile*. Các kết quả xét nghiệm VIDAS *C. difficile* Toxin A & B phải được đánh giá cùng với các dấu hiệu lâm sàng và tiền sử bệnh của Người bệnh khi chẩn đoán các bệnh liên quan đến *C. difficile*.

11. *Helicobacter pylori* Ag test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

Phát hiện định tính nhanh kháng nguyên của *Helicobacter pylori* trong phân của người theo nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Đồng hồ đo thời gian

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------|--------|
| 1 | Lọ đựng bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Panh | Cái |
| 3 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Dụng cụ xét nghiệm | Cái |
| 8 | Giấy thấm | Cuộn |
| 9 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 10 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 11 | Bút viết kính | Cái |
| 12 | Bút bi | Cái |
| 13 | Mũ | Cái |
| 14 | Khẩu trang | Cái |
| 15 | Găng tay | Đôi |
| 16 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 17 | Quần áo bảo hộ | Bộ |

| | | |
|----|----------------------------|-----|
| 18 | Dung dịch xà phòng rửa tay | MI |
| 19 | Còn sát trùng tay nhanh | MI |
| 20 | Dung dịch khử trùng | MI |
| 21 | Khăn lau tay | Cái |

3. Bệnh phẩm: Phân

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15- 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên người bệnh trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Hút dung môi pha loãng lên tới vạch rồi nhỏ vào ống nghiệm. Thực hiện thao tác này 2 lần.
- Dùng tăm bông lấy khoảng 50 mg phân đưa vào ống nghiệm và xoay tăm bông khoảng 10 lần. Sau đó ép chặt tăm bông lên thành ống nghiệm rồi loại bỏ tăm bông.
- Đậy nắp nhỏ giọt vào ống nghiệm.
- Nhỏ 3 giọt dung dịch pha loãng vào giếng đã mẫu hình tròn, chữ “S”.
- Đọc kết quả trong khoảng 10-15 phút. Không được đọc kết quả sau 15 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu: C là vạch chứng (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|---------------------------------------------------|------------------|
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu ở vùng C và T | Dương tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch ở vùng C | Âm tính |
| Trên thanh thử không xuất hiện vạch C | Không có giá trị |
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch ở vùng T | Không có giá trị |

Lưu ý: Nếu vạch control không chuyển màu chứng tỏ test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch màu tại vạch C).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu càng sớm càng tốt. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài.

12. *Helicobacter pylori* Ab test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện định tính nhanh kháng thể IgG kháng *Helicobacter pylori* và kháng thể kháng yếu tố nhiễm trùng tái tổ hợp hiện có (CIM-current infection marker) trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh kháng thể IgG và CIM dựa trên nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch gián tiếp.

II. CHUẨN BỊ

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Đầu côn 200 µl | Cái |
| 12 | Giấy thấm | Cuộn |

| | | |
|----|------------------------------------|-----|
| 13 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 14 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Bút viết kính | Cái |
| 16 | Bút bi | Cái |
| 17 | Mũ | Cái |
| 18 | Khẩu trang | Cái |
| 19 | Găng tay | Đôi |
| 20 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 21 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 22 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 25 | Khăn lau tay | Cái |
| 26 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm:

Huyết thanh, huyết tương, máu toàn phần.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

Bộ sinh phẩm Assure *H.pylori* Rapid Test (MP) (VD hoặc sinh phẩm tương đương)

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15-20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên Người bệnh trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.

* Nếu bệnh phẩm là huyết thanh/huyết tương:

- Hút 25 µl bệnh phẩm nhỏ vào giếng hình vuông.

- Chờ tới khi bệnh phẩm di chuyển tới vạch màu hồng JUST PAST (vạch A) thì nhỏ 2 giọt CHASE BUFFER vào giếng hình tròn ở đầu thanh thử.
 - Kéo miếng mika có chữ HP cho tới khi gặp sức cản không kéo được nữa thì nhỏ 1 giọt CHASE BUFFER vào giếng nhỏ bệnh phẩm hình vuông.
 - Đọc kết quả trong vòng 15 phút. Không được đọc kết quả sau 15 phút.
- *Nếu bệnh phẩm là máu toàn phần:
- Hút 25 µl bệnh phẩm nhỏ vào giếng nhỏ bệnh phẩm hình vuông, tiếp theo nhỏ 1 giọt CHASE BUFFER vào giếng này.
 - Chờ tới khi bệnh phẩm di chuyển tới vạch màu hồng JUST PAST (vạch A) thì nhỏ 3 giọt CHASE BUFFER vào giếng hình tròn ở đầu thanh thử.
 - Kéo miếng mika có chữ HP cho tới khi gặp sức cản không kéo được nữa thì dừng lại.
 - Đọc kết quả trong vòng 15 phút. Không được đọc kết quả sau 15 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng:

Vạch chứng có màu hồng nhạt trước khi xét nghiệm phải có sự chuyển sang màu hồng đậm khi tiến hành phản ứng. Nếu như vạch này không thay đổi màu chứng tỏ thanh thử không có giá trị.

2. Diễn giải kết quả:

* Kết quả thử nghiệm có thể như bảng sau:

| Hiện tượng | | | Kết quả |
|----------------|--------------|--------------|------------------|
| Vạch A (chứng) | Vạch B (CIM) | Vạch C (IgG) | |
| + | + | + | Dương tính |
| + | - | + | Dương tính |
| + | - | - | Âm tính |
| - | ± | ± | Không có giá trị |
| + | + | - | Không có giá trị |

* Biện luận kết quả:

- Nếu chỉ có IgG dương tính: Người bệnh đã từng nhiễm *H.pylori*.
- Nếu cả IgG và CIM dương tính: Người bệnh hiện đang bị nhiễm *H.pylori*.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không có sự đổi màu tại vạch chứng A).

Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu càng sớm càng tốt. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Bệnh phẩm máu toàn phần bảo quản ở điều kiện 2 °C – 8 °C trong thời gian ≤ 48 giờ.

13. *Helicobacter pylori* nuôi cấy, định danh và kháng thuốc

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện, định danh và xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *Helicobacter pylori* bằng phương pháp nuôi cấy kính hiển.

2. Nguyên lý

- Sử dụng môi trường chọn lọc để phân lập, phát hiện vi khuẩn *H. pylori*.
- Định danh dựa trên các đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học.
- Thử nghiệm tính kháng thuốc của *H. pylori* bằng kỹ thuật kháng sinh đồ dải giấy khuếch tán theo bậc nồng độ.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường/tủ ấm CO₂
- Máy vortex
- Máy so độ đục
- Pipet
- Đèn cồn, bật lửa
- Que cấy, giá đựng que cấy

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

a. Chi phí cho hóa chất và vật tư tiêu hao nuôi cấy, định danh vi khuẩn *H. pylori*

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------------------------|--------|
| 1 | Môi trường nuôi cấy (Pylori agar- PYL/ HPH agar...) | Đĩa |
| 2 | Môi trường vận chuyển Portagerm | Lọ |
| 3 | Túi Genbag vi hiếu khí | Túi |
| 4 | Canh thang Brain Heart Infusion (37g/1 lít) | ml |
| 5 | Thuốc nhuộm tím Gentian | ml |
| 6 | Lugol | ml |

| | | |
|----|----------------------------------------------|-----|
| 7 | Cồn tẩy 95 ⁰ | ml |
| 8 | Thuốc nhuộm đỏ Fucsin | ml |
| 9 | Thuốc thử Oxydase | ml |
| 10 | Thuốc thử Catalase | ml |
| 11 | Urea (3.9g/100ml) | ml |
| 12 | Nước muối sinh lý | ml |
| 13 | Dầu soi kính | ml |
| 14 | Lam kính | cái |
| 15 | Que cấy nhựa vô trùng | cái |
| 16 | Tube 2 ml vô trùng | cái |
| 17 | Que tre vô trùng để nghiền bệnh phẩm | Cái |
| 18 | Đầu côn 200 μ l vô trùng | cái |
| 19 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 20 | Dung dịch sát khuẩn tay nhanh | ml |
| 21 | Javen + xà phòng + A xít ngâm rửa dụng cụ | ml |
| 22 | Bật lửa | cái |
| 23 | Mũ | cái |
| 24 | Găng tay | đôi |
| 25 | Khẩu trang | cái |
| 26 | Giấy lau | tờ |
| 27 | Găng xử lý dụng cụ | đôi |
| 28 | Khay đựng bệnh phẩm | cái |
| 29 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | cái |
| 30 | Bút dạ | cái |
| 31 | Bông | kg |
| 32 | Cồn 70 ⁰ | ml |
| 33 | Túi đựng rác | cái |
| 34 | Áo phòng xét nghiệm | cái |
| 35 | Sổ xét nghiệm | tờ |
| 36 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | tờ |
| 37 | Nội kiểm tra chất lượng(QC)* (nếu thực hiện) | |
| 38 | Ngoại kiểm tra (EQAS)* (nếu thực hiện) | |

b. Chi phí cho hóa chất và vật tư tiêu hao thử nghiệm kháng thuốc với vi khuẩn *H. pylori*

| TT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1. | Môi trường làm kháng sinh đồ cho vi khuẩn <i>H. pylori</i> (Mueller Hinton agar + 5% máu ngựa + NAD | Đĩa |
| 2. | Thanh Etest | Thanh |
| 3. | Túi Genbag vi hiếu khí | Túi |
| 4. | Canh thang Brain Heart Infusion (37g/1 lít) | ml |
| 5. | Ống nước muối sinh lý vô trùng | ống |
| 6. | Que tăm bông vô trùng | cái |
| 7. | Đầu côn 200 μ l vô trùng | cái |
| 8. | Dung dịch sát khuẩn tay nhanh | ml |
| 9. | Javen + xà phòng + A xít ngâm rửa dụng cụ | ml |
| 10. | Mũ | cái |
| 11. | Găng tay | đôi |
| 12. | Khẩu trang | cái |
| 13. | Giấy lau | tờ |
| 14. | Găng xử lý dụng cụ | đôi |
| 15. | Bút dạ | cái |
| 16. | Bông | kg |
| 17. | Cồn 70 ⁰ | ml |
| 18. | Túi đựng rác | cái |
| 19. | Áo phòng xét nghiệm | cái |
| 20. | Sổ xét nghiệm | tờ |
| 21. | Giấy trả kết quả xét nghiệm | tờ |
| 22. | Chủng <i>H. pylori</i> ATCC 43504 (không quá 4 chu kỳ chuyển) | Chủng |
| 23. | Nội kiểm tra chất lượng(QC)* (nếu thực hiện) | |
| 24. | Ngoại kiểm tra (EQAS)* (nếu thực hiện) | |

* Ghi chú:

- Chi phí nội kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình nội kiểm (QC) là 1/10 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lượng ≥ 10 mẫu cho 1 lần tiến hành kỹ thuật).

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Bệnh phẩm mảnh sinh thiết dạ dày qua ống nội soi

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh

- Lấy bệnh phẩm mảnh sinh thiết dạ dày qua ống nội soi.
- Lấy ở vùng hang vị/ thân vị dạ dày, tại các rìa ổ loét hoặc các vị trí có tổn thương nghi ngờ do *H. pylori* (trợt, niêm mạc sần,...)
- Chuyển bệnh phẩm sinh thiết vào môi trường bảo quản, vận chuyển.
- + Môi trường vận chuyển có thể là nước muối sinh lý vô trùng nếu vận chuyển ngay về khoa xét nghiệm Vi sinh (trong vòng 1h).
- + Nếu thời gian vận chuyển quá 1h giờ sau khi lấy mẫu, các mẫu sinh thiết phải được bảo quản trong môi trường Portagerm pylori, vận chuyển ở nhiệt độ (20-25 °C) tối đa 48h. Với các mẫu lưu trữ lâu dài, bảo quản ở -80°C trong môi trường chứa 30% glycerol.
- Không nhận những mẫu bệnh phẩm đã ngâm trong dung dịch formalin.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1 Nhuộm Gram và nuôi cấy

- Nghiền nát các mảnh sinh thiết bằng dụng cụ chuyên dụng hoặc dùng loop cấy ria trực tiếp mảnh sinh thiết lên mặt đĩa thạch nếu thấy có nhiều nhầy của niêm mạc, phần còn lại dần tiêu bản để nhuộm Gram.
- Đặt đĩa thạch vào trong bình Jar có túi tạo môi trường vi hiếu khí, ủ ấm ở 35-37°C, quan sát sau 3 đến 7 ngày.

2.2 Định danh

Trên môi trường nuôi cấy, khuẩn lạc nghi ngờ *H. pylori* là những khuẩn lạc nhỏ, không màu hoặc trong; Nhuộm Gram có hình cong, xoắn nhẹ, Gram âm; oxydase (+), catalase (+) và urease (+). Trường hợp vi khuẩn mọc ít cần cấy chuyển sang đĩa thạch mới để tăng sinh.

2.3 Thử nghiệm tính kháng thuốc

Từ đĩa nuôi cấy có khuẩn lạc vi khuẩn *H. pylori* thuần khiết:

- Tạo huyền dịch vi khuẩn nồng độ 3 McFarland trong canh thang Mueller Hinton + 5% huyết thanh ngựa hoặc canh thang BHI + 5% huyết thanh ngựa.
- Sau khi ria đều vi khuẩn lên mặt thạch, chờ cho se mặt thạch, dùng panh đầu nhọn đặt Etest lên mặt thạch sao cho mặt có ghi dải nồng độ hướng lên trên và phải đảm bảo toàn bộ bề mặt của thanh Etest được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch; đặt tối đa 1 thanh Etest trên đĩa 90mm.
- Đặt đĩa thạch vào trong bình Jar có túi tạo môi trường vi hiếu khí, ủ ấm ở 35-37°C, 72 giờ.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Khuẩn lạc của *H. pylori* có đỉnh nhọn, mờ và khó nhìn do vậy khi đọc kháng sinh đồ phải nghiêng đĩa thạch và sử dụng ánh sáng xuyên để đọc điểm cắt của hình elip với thanh Etest; Phiên giải kết quả của thanh kháng sinh Etest theo EUCAST.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Kiểm tra chất lượng

- Các loại dụng cụ, hóa chất, sinh phẩm, môi trường nuôi cấy phải còn hạn sử dụng và được kiểm tra chất lượng trước khi sử dụng.
- Sử dụng chủng *H. pylori* ATCC 43504 để kiểm tra chất lượng.

2. An toàn

Coi tất cả các bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm, áp dụng các biện pháp an toàn đối với phòng xét nghiệm An toàn sinh học cấp II.

3. Lưu ý

Nuôi cấy có thể âm tính giả nếu Người bệnh gần đây đã dùng các thuốc kháng sinh hoặc chất ức chế bơm Proton, nên dùng thuốc ức chế bơm Proton 2 tuần và thuốc kháng sinh 4 tuần trước khi nội soi để có kết quả chính xác

14. *Helicobacter pylori* Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định định tính kháng thể IgM hoặc IgG hoặc IgA kháng *H.pylori* trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

2. Nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgM hoặc IgG hoặc IgA dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Pipet đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l .
- Micropipette

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 21 | Găng tay | Đôi |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | EQAS (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm SERION ELISA classic *H. pylori* IgA/IgG/IgM (Serion) (VD hoặc tương đương)

| Các bước | Nội dung |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm |
| 2 | Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự. |
| 3 | Chuẩn bị dung dịch rửa. |
| 4 | Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm. |
| 5 | Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá. |
| 6 | Xử lý trước mẫu với chất hấp thụ yếu tố dạng thấp (RF) trước khi phát hiện IgM. |
| 7 | Cho chứng (1 giếng trống, 1 chứng âm, 2 giếng chuẩn) và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình. |
| 8 | Đậy tấm và ủ. |
| 9 | Rửa phiến nhựa. |
| 10 | Chuẩn bị chất cộng hợp |
| 11 | Đậy tấm và ủ |
| 12 | Rửa phiến nhựa |
| 13 | Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng |
| 14 | Ủ phiến nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng |
| 15 | Nhỏ dung dịch dừng phản ứng |
| 16 | Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 405 và 650nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng. |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng:

- OD giếng trống phải < 0.25
- Chứng âm phải cho kết quả âm tính.
- Giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình của huyết thanh chuẩn phải trong khoảng tham chiếu hợp lệ ghi trong Giấy kiểm tra chất lượng bộ kit (Sau khi trừ đi độ hấp thụ của giếng trắng).
- Sự dao động giá trị OD của huyết thanh chuẩn không được cao hơn 20%.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

2. Diễn giải kết quả:

Đánh giá xét nghiệm dựa trên giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng đặc hiệu số lô với đường chuẩn có trong các bộ thuốc thử để các giá trị OD thu được có thể phản ánh sự hoạt động của kháng thể tương ứng. Giá trị OD của giếng trống phải được trừ ra trước khi tính toán.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chủng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

15. *Helicobacter pylori* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện DNA đặc trưng của *Helicobacter pylori* từ mảnh sinh thiết dạ dày.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Chày cối nghiền
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C)
- Micropipettes các thể tích từ 5-1000 μ l

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Găng không bột tal | cái |
| 3 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 4 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Kit tách chiết DNA | Test |
| 8 | Ống Falcon 50 ml | Cái |
| 9 | Eppendorf 1,7 ml | Tube |
| 10 | Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 11 | Đầu côn 10 µl có lọc | Cái |
| 12 | Đầu côn 30 µl | Cái |
| 13 | Đầu côn 200 µl có lọc | Cái |
| 14 | Đầu côn 1ml có lọc | Cái |
| 15 | Water-DEPC treated | ml |
| 16 | Giấy thấm | Cuộn |
| 17 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 18 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 19 | Bút viết kính | Cái |
| 20 | Bút bi | Cái |
| 21 | Mũ | Cái |
| 22 | Khẩu trang | Cái |
| 23 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 24 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 25 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 26 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 27 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 28 | Khăn lau tay | Cái |
| 29 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Mảnh sinh thiết dạ dày.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

- Lấy qua ống nội soi đường miệng
- Quan sát thấy ổ loét, lấy 4 mẫu (3 mẫu ở các góc tổn thương loét, lấy ở vùng mép (ranh giới) của tổn thương và một mảnh ở trung tâm) hoặc lấy các vị trí có tổn thương nghi ngờ do *H. pylori* (trợt, niêm mạc sần,...)
- Dùng kim lấy máu chuyên bệnh phẩm từ kim sinh thiết vào lọ đựng bệnh phẩm.

2. Tiến hành kỹ thuật:

Bộ sinh phẩm *H. pylori* Real-TM (Sacace –VD hoặc tương đương)

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu

2.2. Tách chiết DNA

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu JOE dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính, đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu JOE âm tính.

2. Phân tích mẫu

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng với màu bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu từ sau chu kỳ 36 → đề nghị lấy mẫu lại để thực hiện xét nghiệm.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính.

3. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT CẦN XỬ TRÍ

Nếu đường đồ thị huỳnh quang của mẫu xuất hiện ở ngoài chu kỳ thứ 40 thì phải cẩn thận kiểm tra và đánh giá lại mẫu.

16. *Leptospira* định danh PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt đoạn gene đặc trưng của *Leptospira* có trong bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Máy điện di
- Máy đọc ảnh gel
- Lò vi sóng
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Ống |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|----------------------------------------------------------------|---------------|
| 2 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 5 | Ống nhựa Eppendoff 1.5ml | ống |
| 6 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 7 | Khẩu hao sinh phẩm cho mẫu chứng các loại, kiểm tra chất lượng | Test |
| 8 | Kit tách chiết DNA | Test |
| 9 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 10 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 11 | Đầu côn 10 ul có lọc | Cái |
| 12 | Đầu côn 30 ul | Cái |
| 13 | Đầu côn 200 ul có lọc | Cái |
| 14 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 15 | Ethanol BDH | ml |
| 16 | Water-DEPC Treated | ml |
| 17 | Thạch | Gram |
| 18 | Ladder | ml |
| 19 | Blue Juice Gel loading dye | ml |
| 20 | Ethidium Bromide (Redgel) | ml |
| 21 | TAE Buffer | ml |
| 22 | Giấy thấm | Cuộn |
| 23 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 24 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 25 | Bút viết kính | Cái |
| 26 | Bút bi | Cái |
| 27 | Mũ | Cái |
| 28 | Khẩu trang | Cái |
| 29 | Găng tay | Đôi |
| 30 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 31 | Quần áo | Bộ |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|------------------------------------------|---------------|
| 32 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 33 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 34 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 35 | Khăn lau tay | cái |
| 36 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA từ bệnh phẩm

2.2. Pha hỗn hợp phản ứng PCR

2.3. Chạy phản ứng PCR

2.4. Điện di sản phẩm PCR

2.5. Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Phản ứng dương tính khi có sản phẩm PCR là một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét, không bị đứt gãy và có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

- Phản ứng âm tính nếu không có vạch sản phẩm PCR có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường

- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế

- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật.

17. *Mycoplasma pneumoniae* Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể (Ab) của *Mycoplasma pneumoniae*.

2. Nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) gián tiếp.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Các pipet đơn kênh thể tích từ 10µl đến 1000µl .
- Micropipette

2.3. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| ST T | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------|--------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |

| | | |
|----|------------------------------------|------|
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 21 | Găng tay | Đôi |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm *Mycoplasma pneumoniae* IgA/IgG/IgM (Serion) (VD hoặc tương đương)

| Các bước | Nội dung |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm |
| 2 | Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự. |
| 3 | Chuẩn bị dung dịch rửa. |
| 4 | Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm. |
| 5 | Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá. |
| 6 | Xử lý trước mẫu với chất hấp thụ yếu tố dạng thấp trước khi phát hiện IgM. |
| 7 | Cho chứng và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của qui trình. |
| 8 | Đậy tấm và ủ. |
| 9 | Rửa phiến nhựa. |
| 10 | Chuẩn bị chất cộng hợp |
| 11 | Đậy tấm và ủ |
| 12 | Rửa phiến nhựa |
| 13 | Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng |
| 14 | Ủ phiến nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng |
| 15 | Nhỏ dung dịch dừng phản ứng |
| 16 | Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 405 và 650nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng. |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Cơ chất trắng cần phải < 0.25 OD.
- Chất chứng âm phải âm tính.
- Giá trị OD của chất chứng dương và giá trị OD trung bình của huyết thanh ngưỡng cần phải nằm trong khoảng hợp lý, được lấy từ giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng đặc hiệu theo lô của bộ xét nghiệm (sau khi trừ đi cơ chất trắng).
- Sự biến thiên của giá trị OD của huyết thanh chuẩn hoặc huyết thanh chứng không được cao hơn 20 %.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

2. Diễn giải kết quả

| Mycoplasma IgA | Mycoplasma IgM | Mycoplasma IgG | Giải thích |
|----------------|----------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - | - | - | Trạng thái huyết thanh âm tính, trong trường hợp nghi nhiễm <i>Mycoplasma</i> lâm sàng theo huyết thanh cần được khám sau 14 ngày. |
| + | + | -/+ | Nghi nhiễm nguyên phát; Kết quả IgA dương tính cùng với kết quả IgM dương tính đặc biệt trong trường hợp bệnh nhân còn trẻ |
| + | - | -/+ | Nghi nhiễm nguyên phát; (trong trường hợp bệnh nhân lớn tuổi hơn tái nhiễm, không thể phát hiện IgM) |
| - | - | + | Nhiễm trong quá khứ theo tỷ lệ mắc bệnh hiện hành theo huyết thanh hoặc nhiễm bệnh nguyên phát không sản sinh kháng thể IgA và IgM (Chú ý hiệu giá IgG tăng) |

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

18. *Mycoplasma hominis* test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nhanh *Mycoplasma hominis* có trong bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh *Mycoplasma hominis* dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch để xác định kháng nguyên *Mycoplasma hominis* có trong bệnh phẩm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Bàn phụ khoa
- Tủ an toàn sinh học
- Đèn phụ khoa

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------|--------|
| 1 | Bộ Kit làm xét nghiệm | test |
| 2 | Micropipette 50 – 200 µl | cái |
| 3 | Đầu côn 200 µl | cái |
| 4 | Bông | Kg |
| 5 | Cồn 90 ⁰ (vệ sinh dụng cụ) | ml |
| 6 | Đèn cồn | Cái |
| 7 | Panh | Cái |
| 8 | Mỏ vệt (to, vừa và nhỏ) | Cái |
| 9 | Thùng đựng dung dịch khử khuẩn ngâm mỏ vệt | Cái |
| 10 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 11 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 12 | Mũ | Cái |
| 13 | Khẩu trang | Cái |

| | | |
|----|-----------------------------|-----|
| 14 | Găng tay | Đôi |
| 15 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 16 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 17 | Ống nghiệm thủy tinh | Ống |
| 18 | Bút viết kính | Cái |
| 19 | Bút bi | Cái |
| 20 | Bật lửa | Cái |
| 21 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 22 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 23 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 24 | Khăn lau tay | Cái |
| 25 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | Tờ |

3. Bệnh phẩm:

Dịch cơ thể nghi ngờ có căn nguyên do *Mycoplasma hominis* gây bệnh.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

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

2. Tiến hành kỹ thuật:

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên Người bệnh trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Tiến hành theo hướng dẫn của nhà cung cấp.
- Đọc kết quả trong vòng 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ hoặc hồng: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|--------------------------------------------------|------------|
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ hoặc hồng | Dương tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (kiểm tra C) | Âm tính |

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Trên thanh thử không xuất hiện vạch C | Test hỏng |
|---------------------------------------|-----------|

Lưu ý: Nếu vạch control không chuyển sang màu đỏ hay màu hồng test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu có thể bảo quản ở nhiệt độ 2°C -8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn -20°C.

19. *Mycoplasma hominis* nhuộm huỳnh quang

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện nhanh *Mycoplasma hominis* từ bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Nếu trong bệnh phẩm có *Mycoplasma hominis*, vi khuẩn sẽ kết hợp với kháng thể đặc hiệu gắn huỳnh quang. Khi soi dưới kính hiển vi huỳnh quang sẽ thấy hình ảnh cầu khuẩn phát sáng màu vàng xanh.

II. CHUẨN BỊ

2. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi huỳnh quang
- Dụng cụ sấy lam (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | |
|-----|-------------------------------------------|--|
| 1 | Lọ lấy bệnh phẩm | |
| 2 | Que lấy bệnh phẩm | |
| 3 | Lam kính | |
| 4 | Nước muối sinh lý | |
| 5 | Thuốc nhuộm <i>Mycoplasma hominis</i> DFA | |
| 6 | Bông | |
| 7 | Côn 90 ⁰ (vệ sinh dụng cụ) | |
| 8 | Đèn côn | |
| 9 | Panh | |
| 10 | Khay đựng bệnh phẩm | |
| 11 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | |

| | | |
|----|-------------------------------------|--|
| 12 | | |
| 13 | Khẩu trang | |
| 14 | Găng tay | |
| 15 | Găng tay xử lý dụng cụ | |
| 16 | Quần áo bảo hộ | |
| 17 | Acid ngậm lam | |
| 18 | Ống nghiệm thủy tinh | |
| 19 | Bút viết kính | |
| 20 | Bút bi | |
| 21 | Bật lửa | |
| 22 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | |
| 25 | Khăn lau tay | |
| 26 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | |
| 27 | Nội kiểm QC (nếu thực hiện) * | |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện) * | |

*Ghi chú:

- Chi phí nội kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình nội kiểm (QC) là 1/10 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lượng

≥ 10 mẫu cho 1 lần tiến hành kỹ thuật).

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch cơ thể nghi ngờ có căn nguyên do *Mycoplasma hominis* gây bệnh.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1 Chuẩn bị tiêu bản

2.2 Nhuộm *Mycoplasma hominis* DFA (direct fluorescent antibody)

- Phủ dung dịch nhuộm huỳnh quang lên tiêu bản, để 2 phút
- Rửa lại bằng nước để loại bỏ huỳnh quang thừa rồi để khô, soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Mycoplasma hominis có hình ảnh cầu khuẩn, bắt màu vàng xanh trên nền tím đen dưới kính hiển vi huỳnh quang.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có thể gây âm tính giả nếu số lượng vi khuẩn quá ít

20. *Mycoplasma hominis* PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt DNA của *Mycoplasma hominis* có trong bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Máy điện di
- Máy đọc ảnh gel
- Lò vi sóng
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Ổng |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|----------------------------------------------------------------|---------------|
| 2 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 5 | Ống nhựa Ependoff 1.5ml | ống |
| 6 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 7 | Khấu hao sinh phẩm cho mẫu chứng các loại, kiểm tra chất lượng | Test |
| 8 | Kit tách chiết DNA | Test |
| 9 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 10 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 11 | Đầu côn 10 ul có lọc | Cái |
| 12 | Đầu côn 30 ul | Cái |
| 13 | Đầu côn 200 ul có lọc | Cái |
| 14 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 15 | Ethanol BDH | ml |
| 16 | Water-DEPC Treated | ml |
| 17 | Thạch | Gram |
| 18 | Ladder | ml |
| 19 | Blue Juice Gel loading dye | ml |
| 20 | Ethidium Bromide (Redgel) | ml |
| 21 | TAE Buffer | ml |
| 22 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 23 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 24 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 25 | Bút viết kính | Cái |
| 26 | Bút bi | Cái |
| 27 | Mũ | Cái |
| 28 | Khẩu trang | Cái |
| 29 | Găng tay | Đôi |
| 30 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 31 | Quần áo | Bộ |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|------------------------------------|--------|
| 32 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 33 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 34 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 35 | Khăn lau tay | cái |
| 36 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch cổ tử cung, dịch âm đạo, dịch niệu đạo và một số dịch cơ thể (dịch ngoáy họng, dịch phết hậu môn) nghi ngờ có căn nguyên do *Mycoplasma hominis* gây bệnh.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA từ bệnh phẩm

2.2. Pha hỗn hợp phản ứng PCR

2.3. Chạy phản ứng PCR

2.4. Điện di sản phẩm PCR

2.5. Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Phản ứng dương tính khi có sản phẩm PCR là một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét, không bị đứt gãy và có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

- Phản ứng âm tính nếu không có vạch sản phẩm PCR có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường
- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế

- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật.

21. *Mycoplasma hominis* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt DNA của *Mycoplasma hominis* trong mẫu bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy Real-time PCR
- Ống Eppendorf 1,5 ml hoặc 2 ml
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Đầu côn có màng lọc 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 2 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Que |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|--------------------------------------------------------|---------------|
| 3 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 4 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 5 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 6 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 7 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 8 | Kit tách chiết DNA | Test |
| 9 | Ống Falcon 50 ml | Cái |
| 10 | Eppendorf 1,7 ml | Tube |
| 11 | Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 12 | Đầu côn 10 µl có lọc | Cái |
| 13 | Đầu côn 30 µl | Cái |
| 14 | Đầu côn 200 µl có lọc | Cái |
| 15 | Đầu côn 1ml có lọc | Cái |
| 16 | Water-DEPC treated | ml |
| 17 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 18 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 19 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 20 | Bút viết kính | Cái |
| 21 | Bút bi | Cái |
| 22 | Mũ | Cái |
| 23 | Khẩu trang | Cái |
| 24 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 25 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 26 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 27 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 28 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 29 | Khăn lau tay | Cái |
| 30 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch cổ tử cung, dịch âm đạo, dịch niệu đạo và một số dịch cơ thể (dịch ngoáy họng, dịch phết hậu môn) nghi ngờ có căn nguyên do *Mycoplasma hominis* gây bệnh.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA theo hướng dẫn sử dụng của Kit tách chiết DNA

2.2. Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR

2.3. Cho một lượng mẫu DNA tách chiết được vào các ống phản ứng PCR có chứa các thành phần cần thiết của kit

2.4. Chạy phản ứng Real-time PCR theo chu trình nhiệt thích hợp

2.4. Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Bước 1: Kiểm tra chứng âm: Chứng âm phải âm tính.

Bước 2: Kiểm tra chứng dương: Chứng dương phải dương tính.

Bước 3: Xác định mẫu dương tính với *Mycoplasma hominis*

Bước 4: Xác định mẫu âm tính với *Mycoplasma hominis*

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường
- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế
- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật.

22. *Rickettsia* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện DNA của *Rickettsia* Real-time trong mẫu bệnh phẩm máu của người.

2. Nguyên lý

Phương pháp phát hiện dựa trên nguyên lý Real-time qPCR khuếch đại gen đặc hiệu của các loài vi khuẩn *Rickettsia*: *Orientia tsutsugamushi* và *Rickettsia typhi*.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy real-time PCR: Máy Real-time PCR có ít nhất 04 kênh màu và hệ thống máy vi tính (VD).
- Máy tách chiết acid nucleic.
- Bộ lưu điện.
- Máy ủ nhiệt.
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm lạnh ≥ 12000 gpm/phút
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ $0,5\ \mu\text{l}$ - $1000\ \mu\text{l}$.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|------------------------------------------------|-------|
| 3 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Cryotube (lưu mẫu) | Cái |
| 6 | Master Mix <i>Rickettsia</i> | Test |
| 7 | Hóa chất và vật tư tiêu hao cho tách chiết | Test |
| 8 | Hóa chất chạy mẫu chứng và kiểm tra chất lượng | Test |
| 9 | Pipet nhựa | Cái |
| 10 | Đầu Pipét có lọc 1000 ul | Cái |
| 11 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 12 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 13 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Quyển |
| 14 | Bút viết kính | Cái |
| 15 | Bút bi | Cái |
| 16 | Mũ giấy | Cái |
| 17 | Khẩu trang | Cái |
| 18 | Găng không có bột tal | Đôi |
| 19 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 20 | Quần áo | Bộ |
| 21 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 22 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 23 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 24 | Khăn lau tay | Cái |
| 25 | Ngoại kiểm (EQAS)* (nếu thực hiện) | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết tương tách từ máu có chất chống đông EDTA.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất được ví dụ ở trên (VD sử dụng bộ sinh phẩm *Rickettsia* rPCR Mix hoặc sinh phẩm tương đương).

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Phát hiện vi khuẩn *Rickettsia* bằng phản ứng Real-time PCR sử dụng Taqman probe.

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu

Phải tách huyết tương trước khi tách chiết DNA.

2.2. Tách chiết DNA

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Kết quả chấp nhận được nếu cả 3 chứng đạt các điều kiện sau:

+ Chứng âm: không phát hiện.

+ Chứng dương: nằm trong khoảng cho phép của nhà sản xuất (đặc hiệu với từng lô thuốc thử).

+ Chứng nội: với chứng âm và mẫu có nồng độ thấp (10-1000copies) phải có tín hiệu lên ứng với Ct khoảng 27 đến 30.

- Ngược lại kết quả không được chấp nhận nếu không đáp ứng các điều kiện trên và phải thực hiện lại xét nghiệm:

2. Phân tích mẫu

1) Mẫu có tín hiệu FAM, ROX giá trị Ct ≤ 42 là mẫu dương tính với *Orientia tsutsugamushi*.

2) Mẫu có tín hiệu HEX, Cy5, ROX giá trị Ct ≤ 42 là mẫu dương tính với *Rickettsia typhi*.

3) Mẫu có tín hiệu Cy5, ROX tín hiệu dương tính với các loài *Rickettsia* còn lại, không phải 2 loài *Orientia tsutsugamushi* và *Rickettsia typhi*.

4) Mẫu có tín hiệu FAM, HEX, Cy5 giá trị Ct > 42 là mẫu nghi ngờ nên cần tiến hành kiểm tra lại bằng phương pháp chạy điện di sản phẩm PCR, hoặc tách chiết lại DNA khuôn từ mẫu bệnh phẩm và chạy lại Real-time PCR để khẳng định kết quả.

5) Mẫu không có tín hiệu FAM, HEX, Cy5 và có tín hiệu ROX là mẫu âm tính

6) Mẫu không có tín hiệu FAM, HEX, Cy5, ROX là mẫu bị ức chế, cần tách chiết DNA (có bổ sung nội chuẩn vào mẫu khi tách chiết) và chạy lại Real-time PCR.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- 1. Sự cố:** Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.
- 2. Nguyên nhân:** Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.
- 3. Khắc phục:** Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

23. *Treponema pallidum* nhuộm huỳnh quang

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện nhanh *Treponema pallidum* từ bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Nếu trong bệnh phẩm có *Treponema pallidum*, vi khuẩn sẽ kết hợp với kháng thể đặc hiệu gắn huỳnh quang. Khi soi dưới kính hiển vi huỳnh quang sẽ thấy hình ảnh xoắn khuẩn phát sáng màu vàng xanh.

II. CHUẨN BỊ

3. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1 Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi huỳnh quang
- Dụng cụ sấy lam (nếu có)

2.2 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-------------------------------------------|--------|
| 1 | Lọ lấy bệnh phẩm | lọ |
| 2 | Que lấy bệnh phẩm | cái |
| 3 | Lam kính | cái |
| 4 | Nước muối sinh lý | ml |
| 5 | Thuốc nhuộm <i>Treponema pallidum</i> DFA | ml |
| 6 | Bông | kg |
| 7 | Cồn 90 ⁰ (vệ sinh dụng cụ) | ml |
| 8 | Đèn cồn | cái |
| 9 | Panh | cái |
| 10 | Khay đựng bệnh phẩm | cái |

| | | |
|----|-------------------------------------|-----|
| 11 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | cái |
| 12 | Mũ | cái |
| 13 | Khẩu trang | cái |
| 14 | Găng tay | đôi |
| 15 | Găng tay xử lý dụng cụ | đôi |
| 16 | Quần áo bảo hộ | bộ |
| 17 | Acid ngậm lam | ml |
| 18 | Ống nghiệm thủy tinh | ống |
| 19 | Bút viết kính | cái |
| 20 | Bút bi | cái |
| 21 | Bật lửa | cái |
| 22 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | tờ |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Khăn lau tay | cái |
| 26 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | tờ |
| 27 | QC (nếu thực hiện) * | |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện) * | |

*Ghi chú:

- Chi phí nội kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình nội kiểm (QC) là 1/10 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lượng

≥ 10 mẫu cho 1 lần tiến hành kỹ thuật).

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch cơ thể nghi ngờ có căn nguyên do *Treponema pallidum* gây bệnh: Tổn thương loét, đào ban, vết trọt, hạch...

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

2.2. Nhuộm *Treponema pallidum* DFA (direct fluorescent antibody)

- Phủ dung dịch nhuộm huỳnh quang lên tiêu bản, để 2 phút
- Rửa lại bằng nước để loại bỏ huỳnh quang thừa rồi để khô, soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Treponema pallidum có hình ảnh xoắn khuẩn, bắt màu vàng xanh trên nền tím đen dưới kính hiển vi huỳnh quang.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có thể gây âm tính giả nếu số lượng vi khuẩn quá ít.

24. *Treponema pallidum* test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nhanh *Treponema pallidum* có trong bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch in vitro để xác định kháng nguyên *Treponema pallidum* có trong máu Người bệnh.

II. CHUẨN BỊ

4. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm để bàn
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Micropipette thể tích 50 – 200 µl
- Đầu côn 200 µl
- Đồng hồ bấm giây

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|---------------------------------------|--------|
| 1 | Sinh phẩm chẩn đoán | test |
| 2 | Micropipette 50 – 200 µl | cái |
| 3 | Đầu côn 200 µl | cái |
| 4 | Bông | Kg |
| 5 | Dây garô | Cái |
| 6 | Côn | ml |
| 7 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 8 | Cồn 90 ⁰ (vệ sinh dụng cụ) | ml |
| 9 | Đèn cồn | Cái |

| | | |
|----|-------------------------------------|-----|
| 10 | Panh | Cái |
| 11 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 12 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 13 | Ống đựng bệnh phẩm | Cái |
| 14 | Mũ | Cái |
| 15 | Khẩu trang | Cái |
| 16 | Găng tay | Đôi |
| 17 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 18 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 19 | Ống nghiệm thủy tinh | Ống |
| 20 | Bút viết kính | Cái |
| 21 | Bút bi | Cái |
| 22 | Bật lửa | Cái |
| 23 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 24 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 25 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 26 | Khăn lau tay | Cái |
| 27 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 28 | QC (nếu thực hiện) * | |
| 29 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện) * | |

**Ghi chú:*

- Chi phí nội kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình nội kiểm (QC) là 1/10 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lượng

≥ 10 mẫu cho 1 lần tiến hành kỹ thuật).

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm:

Huyết tương, huyết thanh.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên Người bệnh trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Tiến hành theo hướng dẫn của nhà cung cấp.
- Đọc kết quả trong vòng 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ hoặc hồng: C là vạch kiểm tra chất chứng (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch.

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|--------------------------------------------------|------------|
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ hoặc hồng | Dương tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (kiểm tra C) | Âm tính |
| Trên thanh thử không xuất hiện vạch C | Test hỏng |

* **Lưu ý:** Nếu vạch control không chuyển sang màu đỏ hay màu hồng test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu có thể bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn -20°C.

25. *Treponema pallidum* PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt bộ gen của *Treponema pallidum* có trong bệnh phẩm của người

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Máy điện di
- Máy đọc ảnh gel
- Lò vi sóng
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Ổng |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|----------------------------------------------------------------|---------------|
| 2 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm cho mẫu chứng các loại, kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Kit tách chiết DNA/RNA | Test |
| 8 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 9 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 10 | Đầu côn 10 ul có lọc | Cái |
| 11 | Đầu côn 30 ul | Cái |
| 12 | Đầu côn 200 ul có lọc | Cái |
| 13 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 14 | Ethanol BDH | ml |
| 15 | Water-DEPC Treated | ml |
| 16 | Thạch | Gram |
| 17 | Ladder | ml |
| 18 | Blue Juice Gel loading dye | ml |
| 19 | Ethidium Bromide (hoặc Redgel) | ml |
| 20 | TAE Buffer | ml |
| 21 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 22 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Quyển |
| 23 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 25 | Bút viết kính, bút bi, diêm | Cái |
| 26 | Xà phòng | Bánh |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Bông, cồn | Túi |
| 29 | Nước muối sinh lý | ml |
| 30 | Hộp lưu bệnh phẩm | Cái |
| 31 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 32 | Mũ | Cái |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|------------------------------------------|---------------|
| 33 | Khẩu trang | Cái |
| 34 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 35 | Giấy thấm | Cuộn |
| 36 | Ngoại kiểm EQAS (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú: Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch cơ thể nghi ngờ có căn nguyên do *Treponema pallidum* gây bệnh: Tôn thương loét, đào ban, vết trợt, hạch...

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA từ bệnh phẩm

2.2. Pha hỗn hợp phản ứng PCR

2.3. Chạy phản ứng PCR

2.4. Điện di sản phẩm PCR

2.5. Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Phản ứng dương tính khi có sản phẩm PCR là một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét, không bị đứt gãy và có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

- Phản ứng âm tính nếu không có vạch sản phẩm PCR có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường
- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế
- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật.

26. *Treponema pallidum* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt của *Treponema pallidum* trong dịch sinh dục của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy Real-time PCR của hãng Eppendorf
- Ống Eppendorf 1,5 ml hoặc 2 ml
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Đầu côn có màng lọc 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------|--------|
| 1 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|---------------------------------------------------------------------------|--------|
| 5 | Sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho chẩn đoán | Test |
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Hóa chất và vật tư tiêu hao cho tách acid nucleic | Test |
| 10 | Ống Falcon 50 ml | Cái |
| 11 | Eppendorf 1,7 ml | Tube |
| 12 | Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 13 | Đầu côn 10 µl có lọc | Cái |
| 14 | Đầu côn 30 µl | Cái |
| 15 | Đầu côn 200 µl có lọc | Cái |
| 16 | Đầu côn 1ml có lọc | Cái |
| 17 | Water-DEPC treated | ml |
| 18 | Giấy thấm | Cuộn |
| 19 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 20 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 21 | Bút viết kính | Cái |
| 22 | Bút bi | Cái |
| 23 | Mũ | Cái |
| 24 | Khẩu trang | Cái |
| 25 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 26 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 27 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 28 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 29 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 30 | Khăn lau tay | Cái |
| 31 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch cơ thể nghi ngờ có căn nguyên do *Treponema pallidum* gây bệnh: Tôn thương loét, đào ban, vết trọt, hạch...

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA theo hướng dẫn sử dụng của Kit tách chiết DNA

2.2. Cho một lượng mẫu DNA tách chiết được vào các ống phản ứng PCR có chứa các thành phần cần thiết của kit

2.3. Chạy phản ứng PCR theo chu trình nhiệt thích hợp trên máy Real-time PCR

2.4. Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Bước 1: Kiểm tra chứng âm

Bước 2: Kiểm tra chứng dương

Bước 3: Xác định mẫu dương tính với *Treponema pallidum*

Bước 4: Xác định mẫu âm tính với *Treponema pallidum*

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường
- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế
- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật

27. *Ureaplasma urealyticum* test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nhanh *Ureaplasma urealyticum* có trong bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh *Ureaplasma urealyticum* dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch in vitro để xác định định tính kháng nguyên *Ureaplasma urealyticum* có trong bệnh phẩm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Bàn phụ khoa
- Đèn phụ khoa
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Đồng hồ bấm giây

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------|--------|
| 1 | Sinh phẩm chẩn đoán | test |
| 2 | Micropipette 50 – 200 µl | cái |
| 3 | Đầu côn 200 µl | cái |
| 4 | Bông, tăm bông | Kg |
| 5 | Cồn 90 ⁰ (vệ sinh dụng cụ) | ml |
| 6 | Đèn cồn | Cái |
| 7 | Panh | Cái |
| 8 | Mỏ vệt (to, vừa và nhỏ) | Cái |
| 9 | Thùng đựng dung dịch khử khuẩn ngâm mỏ vệt | |
| 10 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|-------------------------------------|-----|
| 11 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 12 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Cái |
| 13 | Mũ | Cái |
| 14 | Khẩu trang | Cái |
| 15 | Găng tay | Đôi |
| 16 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 17 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 18 | Ống nghiệm thủy tinh | Ống |
| 19 | Bút viết kính | Cái |
| 20 | Bút bi | Cái |
| 21 | Bật lửa | Cái |
| 22 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Khăn lau tay | Cái |
| 26 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 27 | QC (nếu thực hiện) * | |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện) * | |

* Ghi

chú:

- Chi phí nội kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình nội kiểm (QC) là 1/10 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lượng

≥ 10 mẫu cho 1 lần tiến hành kỹ thuật).

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm:

Mủ hoặc dịch niệu đạo, âm đạo, dịch ngoáy họng.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên Người bệnh trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Tiến hành theo hướng dẫn của nhà cung cấp.
- Đọc kết quả trong vòng 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ hoặc hồng: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|--------------------------------------------------|------------|
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ hoặc hồng | Dương tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (kiểm tra C) | Âm tính |
| Trên thanh thử không xuất hiện vạch C | Test hỏng |

Lưu ý: Nếu vạch control không chuyển sang màu đỏ hay màu hồng test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu có thể bảo quản ở nhiệt độ 2°C -8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn -20°C.

28. *Ureaplasma urealyticum* nhuộm huỳnh quang

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện nhanh *Ureaplasma urealyticum* từ bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Nếu trong bệnh phẩm có *Ureaplasma urealyticum*, vi khuẩn sẽ kết hợp với kháng thể đặc hiệu gắn huỳnh quang. Khi soi dưới kính hiển vi huỳnh quang sẽ thấy hình ảnh vi khuẩn phát sáng màu vàng xanh.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi huỳnh quang
- Dụng cụ sấy lam (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------------------|--------|
| 1 | Lọ lấy bệnh phẩm | lọ |
| 2 | Que lấy bệnh phẩm | cái |
| 3 | Lam kính | cái |
| 4 | Nước muối sinh lý | ml |
| 5 | Thuốc nhuộm <i>Ureaplasma urealyticum</i> DFA | ml |
| 6 | Bông | kg |
| 7 | Côn 90 ⁰ (vệ sinh dụng cụ) | ml |
| 8 | Đèn côn | cái |
| 9 | Panh | cái |
| 10 | Mỏ vệt (to, vừa và nhỏ) | Cái |
| 11 | Thùng đựng dung dịch khử khuẩn ngâm mỏ vệt | Cái |

| | | |
|----|-------------------------------------|-----|
| 12 | Khay đựng bệnh phẩm | cái |
| 13 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | cái |
| 14 | Mũ | cái |
| 15 | Khẩu trang | cái |
| 16 | Găng tay | đôi |
| 17 | Găng tay xử lý dụng cụ | đôi |
| 18 | Quần áo bảo hộ | bộ |
| 19 | Acid ngậm lam | ml |
| 20 | Ống nghiệm thủy tinh | ống |
| 21 | Bút viết kính | cái |
| 22 | Bút bi | cái |
| 23 | Bật lửa | cái |
| 24 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | tờ |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 27 | Khăn lau tay | cái |
| 28 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | tờ |
| 29 | Nội kiểm QC (nếu thực hiện) * | |
| 30 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện) * | |

* Ghi chú:

- Chi phí nội kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình nội kiểm (QC) là 1/10 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lượng ≥ 10 mẫu cho 1 lần tiến hành kỹ thuật).

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Mủ hoặc dịch niệu đạo, âm đạo, dịch ngoáy họng.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

2.2. Nhuộm *Ureaplasma urealyticum* DFA (direct fluorescent antibody)

- Phủ dung dịch nhuộm huỳnh quang lên tiêu bản, để 2 phút
- Rửa lại bằng nước để loại bỏ huỳnh quang thừa rồi để khô, soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- *Ureaplasma urealyticum* có hình ảnh cầu khuẩn, bắt màu vàng xanh trên nền tím đen dưới kính hiển vi huỳnh quang.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có thể gây âm tính giả nếu số lượng vi khuẩn quá ít.

29. *Ureaplasma urealyticum* PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt bộ gen của *Ureaplasma urealyticum* có trong bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Máy điện di
- Máy đọc ảnh gel
- Lò vi sóng
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Ổng |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|----------------------------------------------------------------|---------------|
| 2 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 5 | Ống nhựa Eppendorf 1.5ml | ống |
| 6 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 7 | Khấu hao sinh phẩm cho mẫu chứng các loại, kiểm tra chất lượng | Test |
| 8 | Kit tách chiết DNA/RNA | Test |
| 9 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 10 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 11 | Đầu cân 10 ul có lọc | Cái |
| 12 | Đầu cân 30 ul | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 ul có lọc | Cái |
| 14 | Đầu cân 1 ml có lọc | Cái |
| 15 | Ethanol BDH | ml |
| 16 | Water-DEPC Treated | ml |
| 17 | Thạch | Gram |
| 18 | Ladder | ml |
| 19 | Blue Juice Gel loading dye | ml |
| 20 | Ethidium Bromide (Redgel) | ml |
| 21 | TAE Buffer | ml |
| 22 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 23 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 24 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 25 | Bút viết kính | Cái |
| 26 | Bút bi | Cái |
| 27 | Mũ | Cái |
| 28 | Khẩu trang | Cái |
| 29 | Găng tay | Đôi |
| 30 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|------------------------------------------|---------------|
| 31 | Quần áo | Bộ |
| 32 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 33 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 34 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 35 | Khăn lau tay | cái |
| 36 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Mủ hoặc dịch niệu đạo, âm đạo, dịch ngoáy họng.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA từ bệnh phẩm

2.2. Pha hỗn hợp phản ứng PCR

2.3. Chạy phản ứng PCR

2.4. Điện di sản phẩm PCR

2.5. Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Phản ứng dương tính khi có sản phẩm PCR là một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét, không bị đứt gãy và có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

- Phản ứng âm tính nếu không có vạch sản phẩm PCR có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường
- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế

- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật.

30. *Ureaplasma urealyticum* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt DNA của *Ureaplasma urealyticum* trong bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy Real-time PCR
- Ống Eppendorf 1,5 ml hoặc 2 ml
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Đầu côn có màng lọc 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l và 1000 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Găng không bột tal | cái |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------------|--------|
| 3 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 6 | Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Kit tách chiết DNA | Test |
| 9 | Ống Falcon 50 ml | Cái |
| 10 | Eppendorf 1,7 ml | Tube |
| 11 | Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 12 | Đầu côn 10 µl có lọc | Cái |
| 13 | Đầu côn 30 µl | Cái |
| 14 | Đầu côn 200 µl có lọc | Cái |
| 15 | Đầu côn 1ml có lọc | Cái |
| 16 | Water-DEPC treated | ml |
| 17 | Giấy thấm | Cuộn |
| 18 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 19 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 20 | Bút viết kính | Cái |
| 21 | Bút bi | Cái |
| 22 | Mũ | Cái |
| 23 | Khẩu trang | Cái |
| 24 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 25 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 26 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 27 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 28 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 29 | Khăn lau tay | Cái |
| 30 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú: - Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Mủ hoặc dịch niệu đạo, âm đạo, dịch ngoáy họng.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật: VD sinh phẩm hóa chất vật tư tiêu hao *Ureaplasma urealyticum* rPCR kit hoặc tương đương

2.1. Tách chiết DNA

2.2. Cho một lượng mẫu DNA tách chiết được vào các ống phản ứng PCR có chứa các thành phần cần thiết của kit

2.3. Chạy phản ứng PCR theo chu trình nhiệt thích hợp trên máy Real-time

PCR 2.4. Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Bước 1: Kiểm tra nguy cơ ngoại nhiễm

- Kết quả chứng (-) không có đường tín hiệu khuếch đại với kênh màu FAM: mẫu không bị ngoại nhiễm.

- Kết quả chứng (-) có đường tín hiệu khuếch đại với kênh màu FAM: mẫu bị ngoại nhiễm, phải tiến hành tách chiết DNA lại.

Bước 2: Kiểm tra độ nhạy

- Chọn chứng (+) và chứng (-) và phân tích trên kênh màu FAM và HEX

- Kết quả chứng (-) có đường tín hiệu khuếch đại với kênh màu HEX: PCR không bị ức chế.

- Kết quả chứng (-) không có đường tín hiệu khuếch đại hoặc tín hiệu thấp với kênh màu HEX, PCR bị ức chế toàn phần hay một phần, tách chiết DNA lại hoặc pha loãng DNA trước khi chạy PCR.

Bước 3: Xác định mẫu dương tính

- Mẫu có tín hiệu huỳnh quang với kênh màu FAM và có Ct: là những mẫu dương tính

- Các mẫu có Ct <12 và tín hiệu huỳnh quang không tăng theo chu kỳ nhiệt: pha loãng DNA mẫu với tỉ lệ 1/5 trước khi cho vào PCR master mix

Bước 4: Xác định mẫu âm tính

- Mẫu không có tín hiệu khuếch đại với màu FAM và dương tính với màu HEX, thì kết quả là mẫu bệnh phẩm âm tính

- Nếu mẫu có tín hiệu khuếch đại với màu FAM nhưng không có Ct và dương tính với màu HEX, thì kết quả dưới ngưỡng phát hiện

- Nếu mẫu không có tín hiệu khuếch đại với màu FAM và âm tính với màu

HEX → mẫu bị ức chế cần tiến hành lại PCR với DNA đã pha loãng hoặc tách chiết lại. Nếu kết quả vẫn như cũ thì phải lấy lại mẫu bệnh phẩm làm xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường
- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế
- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật.

31. Virus Ag miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên (Ag) kháng virus

2. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật CMIA (miễn dịch gắn enzym) gián tiếp (VD hoặc nguyên lý tương đương).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị: lấy ví dụ một hệ thống hoặc các hệ thống tương đương khác

- Hệ thống máy ARCHITECT i2000SR
- Pipet tự động hay bán tự động điều chỉnh được dùng phân phối các thể tích từ 2 µl đến 200 µl .
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| ST T | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn | Test |
| 11 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 12 | ARC.trigger solution | ml |
| 13 | ARC.Pre-Trigger Solution | ml |
| 14 | ARC.Concentrated Wash Buffer | ml |
| 15 | ARC.probe conditioning solution | ml |
| 16 | RV (Reaction Vessels): | Cái |
| 17 | Sample Cups | Cái |
| 18 | Septum | Cái |
| 19 | Giấy thấm | Cuộn |
| 20 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 21 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 22 | Bút viết kính | Cái |
| 23 | Bút bi | Cái |
| 24 | Mũ | Cái |
| 25 | Khẩu trang | Cái |
| 26 | Găng tay | Đôi |
| 27 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 28 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 29 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 30 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 31 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 32 | Khăn lau tay | Cái |
| 33 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất ví dụ sử dụng sinh phẩm bộ sinh phẩm Architect HBsAg Qualitative II Reagent Kit (hoặc sử dụng sinh phẩm tương đương)

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Architect HBsAg Qualitative II Reagent Kit (VD hoặc tương đương)

4. Quy trình chạy mẫu HBsAg Qualitative II:

| Các bước | Nội dung |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1 | Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa. |
| 3.2 | Vào Reagent để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn: + Nếu tại vị trí có ô HBsAg hiển thị dòng chữ no cal có nghĩa đó là lô thuốc thử mới cần phải hiệu chuẩn. + Khi chạy chứng HBsAg Qual II Control thấy kết quả vượt ra ngoài dải giới hạn cho phép. |
| 3.3 | Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên (nếu thấy cần thiết) thì tiến hành chạy chứng (Tham khảo quy trình chạy chứng-qui trình vận hành máy i2000...) |
| 3.4 | Chạy mẫu theo các bước sau: |
| 3.4.1 | Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu Người bệnh 3000 vòng trong 10 phút. |
| Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 3.4.2 – 3.4.9: | |
| 3.4.2 | Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng. |
| 3.4.3 | Vào màn hình Patient Order → Single Patient . |
| 3.4.4 | Nhập - C/P : vị trí mẫu trên khay/ mã khay chứa mẫu - SID : mã số Người bệnh |
| 3.4.5 | Chọn tên test là HbsAg |
| 3.4.6 | Chọn Sample details để nhập thêm thông tin Người bệnh (nếu cần) |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.4.7 | Nhấn ADD ORDER (F3) . |
| 3.4.8 | Đưa khay mẫu vào khu nạp giá mẫu ở vị trí chạy mẫu Người bệnh thường quy. |
| 3.4.9 | Khởi động chạy RUN - Trên màn hình chính, chọn SH & PM - Nhấn RUN (F8) |
| Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 3.4.10 – 3.4.12: | |
| 3.4.10 | Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Labconn |
| 3.4.11 | Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu |
| 3.4.12 | Nhấn RUN (F8) |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính giá trị ngưỡng:

Máy sẽ tự động tính toán kết quả dựa trên tỉ lệ RLU (Relative Light Unit) mẫu với RLU ngưỡng (S/CO) cho mỗi mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng.

+ Ngưỡng RLU = (0,0575 x Giá trị trung bình RLU của mẫu chuẩn 1) + (0,8 x Giá trị trung bình RLU của mẫu chuẩn 2)

+ S/CO = RLU mẫu/RLU ngưỡng

2. Diễn giải kết quả

Kết quả được diễn giải như bảng dưới đây:

| Kết quả ban đầu (S/CO) | Diễn giải trên thiết bị | Quy trình xét nghiệm lại |
|------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| < 1,00 | KHÔNG PHẢN ỨNG | Không cần thực hiện lại xét nghiệm |
| ≥ 1,00 | PHẢN ỨNG | Xét nghiệm lại lần 2 (nếu cần) |

- Tất cả những mẫu bệnh phẩm sau khi kiểm tra lại lần 2:

+ Nếu S/CO < 1 thì kết luận âm tính.

+ Nếu S/CO ≥ 1 giống như lần đầu thì kết luận dương tính.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả hoặc phản ứng không xảy ra thông thường do:

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

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.
- Các màng ngăn phải được dùng để tránh sự bay hơi và nhiễm chéo nhằm đảm bảo tính đồng nhất của thuốc thử. Nếu không, độ tin cậy của kết quả xét nghiệm sẽ không được đảm bảo.
- Để tránh nhiễm chéo, cần mang găng tay sạch khi đặt màng ngăn lên chai thuốc thử đã mở nắp.
- Khi đã đặt màng ngăn lên chai thuốc thử đã mở nắp, không được lật ngược chai thuốc thử vì có thể làm chảy thuốc thử ra ngoài và ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm
- Nếu chai Vi hạt bị đổ (được đậy bằng màng ngăn) khi đang bảo quản trong tủ lạnh thì phải hủy bỏ bộ thuốc thử
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).
- Không nên dùng mẫu đã thấy rõ bị nhiễm khuẩn bằng mắt thường.
- Mẫu máu từ Người bệnh có điều trị heparin có thể bị kết tủa từng phần và sự xuất hiện của fibrin có thể dẫn đến sai số. Để tránh trường hợp này, nên lấy máu trước khi dùng liệu pháp heparin.
- Không dùng mẫu máu bị tán huyết nhiều

32. Virus Ab miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể (Ab) kháng virus trong mẫu bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật CMIA (miễn dịch gắn enzym) gián tiếp (VD hoặc nguyên lý tương đương).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị: lấy ví dụ một hệ thống hoặc các hệ thống tương đương khác

- Hệ thống máy ARCHITECT i2000SR
- Pipet tự động hay bán tự động điều chỉnh được dùng phân phối các thể tích từ 2 μ l đến 200 μ l .
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2 . Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn | Test |
| 11 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 12 | ARC.trigger solution | ml |
| 13 | ARC.Pre-Trigger Solution | ml |
| 14 | ARC.Concentrated Wash Buffer | ml |
| 15 | ARC.probe conditioning solution | ml |
| 16 | RV (Reaction Vessels): | Cái |
| 17 | Sample Cups | Cái |
| 18 | Septum | Cái |
| 19 | Giấy thấm | Cuộn |
| 20 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 21 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 22 | Bút viết kính | Cái |
| 23 | Bút bi | Cái |
| 24 | Mũ | Cái |
| 25 | Khẩu trang | Cái |
| 26 | Găng tay | Đôi |
| 27 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 28 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 29 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 30 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 31 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 32 | Khăn lau tay | Cái |
| 33 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất ví dụ sử dụng sinh phẩm bộ sinh phẩm Architect Anti-HCV hoặc sử dụng sinh phẩm tương đương.

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Architect Anti-HCV (VD hoặc tương đương)

3. Quy trình chạy mẫu anti-HCV:

| Các bước | Nội dung |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1 | Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests đã được nạp vào máy, ước lượng xem số test đó đã đủ dùng chưa. |
| 3.2 | Vào Reagent để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn: + Nếu tại vị trí có ô Anti HCV hiển thị dòng chữ no cal có nghĩa đó là lô thuốc thử mới cần phải hiệu chuẩn. + Khi chạy chứng Anti HCV Control thấy kết quả vượt ra ngoài dải giới hạn cho phép. |
| 3.3 | Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên (nếu thấy cần thiết) thì tiến hành chạy chứng (Tham khảo quy trình chạy chứng-quy trình vận hành máy i2000...) |
| 3.4 | Chạy mẫu theo các bước sau: |
| 3.4.1 | Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu Người bệnh 3000 vòng trong 10 phút. |
| Nếu chạy mẫu không dùng barcode thì tuân theo các bước từ 3.4.2 – 3.4.9: | |
| 3.4.2 | Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương sample cup tương ứng |
| 3.4.3 | Vào màn hình Orders → Patients Orders → Single Patient |
| 3.4.4 | Nhập - C/P : vị trí mẫu trên khay/ mã khay chứa mẫu - SID : mã số Người bệnh |
| 3.4.5 | Chọn tên test là anti-HCV |
| 3.4.6 | Chọn Sample details để nhập thêm thông tin Người bệnh (nếu cần) |
| 3.4.7 | Nhấn ADD ORDER (F3) . |
| 3.4.8 | Đưa khay mẫu vào khu nạp giá mẫu ở vị trí chạy mẫu Người bệnh thường quy. |
| 3.4.9 | Khởi động chạy RUN |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | - Trên màn hình chính, chọn SH & PM Nhấn RUN (F8) |
| Nếu chạy mẫu có barcode thì tuân theo các bước từ 3.4.10 – 3.4.12: | |
| 3.4.10 | Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Labconn |
| 3.4.11 | Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu |
| 3.4.12 | Nhấn RUN (F8) |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính giá trị ngưỡng:

- Máy sẽ tự động tính giá trị trung bình tín hiệu hóa phát quang Mẫu chuẩn 1 Anti-HCV qua ba lần chạy lặp lại và lưu kết quả.

- Xét nghiệm ARCHITECT Anti-HCV được tính kết quả dựa trên S/CO:

• Tính giá trị ngưỡng:

Ngưỡng RLU = Giá trị trung bình RLU của Calibrator 1 x 0,074

• $S/CO = RLU \text{ mẫu} / RLU \text{ ngưỡng}$

Cut-off (CO) = Giá trị trung bình của các cut-off

3. Diễn giải kết quả

Kết quả được diễn giải như bảng dưới đây:

| Kết quả ban đầu (S/CO) | Diễn giải trên thiết bị | Quy trình xét nghiệm lại |
|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| < 1,00 | KHÔNG PHẢN ỨNG | Không cần thực hiện lại xét nghiệm |
| ≥ 1,00 | PHẢN ỨNG | Xét nghiệm lại lần hai (nếu cần) |

- Tất cả những mẫu bệnh phẩm sau khi kiểm tra lại lần 2:

+ Nếu $S/CO < 1$ thì kết luận âm tính.

+ Nếu $S/CO \geq 1$ giống như lần đầu thì kết luận dương tính.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả hoặc phản ứng không xảy ra thông thường do:

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.

- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.
- Các màng ngăn phải được dùng để tránh sự bay hơi và nhiễm chéo nhằm đảm bảo tính đồng nhất của thuốc thử. Nếu không, độ tin cậy của kết quả xét nghiệm sẽ không được đảm bảo.
- Để tránh nhiễm chéo, cần mang găng tay sạch khi đặt màng ngăn lên chai thuốc thử đã mở nắp.
- Khi đã đặt màng ngăn lên chai thuốc thử đã mở nắp, không được lật ngược chai thuốc thử vì có thể làm chảy thuốc thử ra ngoài và ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm
- Nếu chai Vi hạt bị đổ (được đậy bằng màng ngăn) khi đang bảo quản trong tủ lạnh thì phải hủy bỏ bộ thuốc thử
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).
- Không nên dùng mẫu đã thấy rõ bị nhiễm khuẩn bằng mắt thường.
- Mẫu máu từ Người bệnh có điều trị heparin có thể bị kết tủa từng phần và sự xuất hiện của fibrin có thể dẫn đến sai số. Để tránh trường hợp này, nên lấy máu trước khi dùng liệu pháp heparin.
- Không dùng mẫu máu bị tán huyết nhiều

33. Virus Xpert

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích:

Phát hiện virus gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý:

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để xác định sự có mặt của gen đặc trưng cho virus bằng hệ thống tự động GeneXpert.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy GenXpert
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Pipette

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | kg |
| 2 | Cồn | ml |
| 3 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 4 | Panh | Cái |
| 5 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 6 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 7 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Cái |
| 9 | Kit GeneXpert | Test |
| 10 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 11 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |

| | | |
|----|------------------------------------|------|
| 12 | Đầu cân 10 ul có lọc | Cái |
| 13 | Đầu cân 30 ul | Cái |
| 14 | Đầu cân 200 ul có lọc | Cái |
| 15 | Đầu cân 1 ml có lọc | Cái |
| 16 | Ethanol BDH | ml |
| 17 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 18 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 19 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 20 | Bút viết kính | Cái |
| 21 | Bút bi | Cái |
| 22 | Mũ | Cái |
| 23 | Khẩu trang | Cái |
| 24 | Găng tay | Đôi |
| 25 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 26 | Quần áo | Bộ |
| 27 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 28 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 29 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 30 | Khăn lau tay | cái |
| 31 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Các mẫu bệnh phẩm cơ thể có chứa căn nguyên virus nghi ngờ

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1 Trộn mẫu vào dung dịch ly giải

2.2 Ủ mẫu và cho vào ống Kit

2.3 Thực hiện chạy máy

2.4 Đánh giá và kết luận

3. Thời gian thực hiện: 2 tiếng

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Mẻ xét nghiệm do máy báo kết quả hiện thị màu xanh là kết quả chấp nhận được. Các thông báo khác về lỗi mẫu hoặc lỗi kit sẽ không được chấp nhận.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Trong trường hợp có báo lỗi, cần kiểm tra lại các bước thực hiện xét nghiệm và thực hiện lại xét nghiệm từ đầu.

34. Virus PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích:

Phát hiện sự có mặt gen đặc trưng của virus có trong mẫu bệnh phẩm của người

2. Nguyên lý:

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1 Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Pipette
- Bộ lưu điện

2.2 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|---------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | kg |
| 2 | Cồn | ml |
| 3 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 4 | Panh | Cái |
| 5 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 6 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 7 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chẩn đoán và kiểm tra chất | Test |

| | | |
|----|------------------------------------|------|
| | lượng | |
| 11 | Kit tách chiết DNA/RNA | Test |
| 12 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 13 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 14 | Đầu côn 10 ul có lọc | Cái |
| 15 | Đầu côn 30 ul | Cái |
| 16 | Đầu côn 200 ul có lọc | Cái |
| 17 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 18 | Ethanol BDH | ml |
| 19 | Water-DEPC Treated | ml |
| 20 | Thạch | Gram |
| 21 | Ladder | ml |
| 22 | Blue Juice Gel loading dye | ml |
| 23 | Ethidium Bromide (Redgel) | ml |
| 24 | TAE Buffer | ml |
| 25 | Giấy thấm | Cuộn |
| 26 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 27 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 28 | Bút viết kính | Cái |
| 29 | Bút bi | Cái |
| 30 | Mũ | Cái |
| 31 | Khẩu trang | Cái |
| 32 | Găng tay | Đôi |
| 33 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 34 | Quần áo | Bộ |
| 35 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 36 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 37 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 38 | Khăn lau tay | cái |
| 39 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

3. Bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm cơ thể có chứa virus nghi ngờ

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1 Tách chiết DNA/RNA tổng số

2.2 Thực hiện PCR

2.3 Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4 Đánh giá và kết luận

3. Thời gian thực hiện

6 tiếng

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Phản ứng dương tính khi có sản phẩm PCR là một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét, không bị đứt gãy và có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

- Phản ứng âm tính nếu không có vạch sản phẩm PCR có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Trong trường hợp không có sản phẩm PCR, cần phải kiểm tra lại quá trình tách chiết DNA/RNA tổng số, chất lượng của primers và master mix, và thực hiện lại toàn bộ xét nghiệm.

35. Virus Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định DNA hoặc ARN đặt trung của virus cần tìm.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm bàn dùng cho ống bệnh phẩm 5ml
- Máy ly tâm lạnh dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Máy chạy Real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 8 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm (Ống chống đông 5ml có chứa EDTA/ Tấm bông vô trùng/ Tube đựng bệnh phẩm vô trùng) | Ống |
| 9 | Tube 1,5ml vô trùng | Tube |
| 10 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 11 | Bộ kit chiết tách DNA/RNA tổng số | Hộp |
| 12 | Bộ kit tổng hợp cDNA (Nếu là virus RNA) | Hộp |
| 13 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 14 | Khẩu hao sinh phẩm cho mẫu chứng và kiểm tra chất lượng, standard các loại | Test |
| 15 | Ependoff 1,7ml | Tube |
| 16 | Ependoff 0,2ml | Tube |
| 17 | Đầu côn 10 µl có lọc | Cái |
| 18 | Đầu côn 30 µl có lọc | Cái |
| 19 | Đầu côn 200 µl có lọc | Cái |
| 20 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 21 | Water-DEPC Treated | ml |
| 22 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 23 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 24 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 25 | Bút viết kính | Cái |
| 26 | Bút bi | Cái |
| 27 | Mũ | Cái |
| 28 | Khẩu trang | Cái |
| 29 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 30 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 31 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 32 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|------------------------------------|--------|
| 33 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 34 | Khăn lau tay | Cái |
| 35 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Các loại bệnh phẩm nghi ngờ nhiễm virus cần tìm

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu:

- Tất cả loại bệnh phẩm khi chứa nhiều tạp nhiễm cần được thuần nhất trước khi tách chiết.

2.2. Tách chiết DNA hoặc RNA từ bệnh phẩm bằng bộ kit tách DNA tổng số hoặc RNA tổng số

2.3. Chạy phản ứng RT-PCR dùng môi ngẫu nhiên với virus có bộ gen là RNA (Bỏ qua bước này nếu kit sử dụng real-time PCR có chứa luôn phản ứng RT-PCR)

- Bật máy PCR 15 phút trước khi chạy phản ứng RT-PCR
- Thực hiện bước này với các tube RT-PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube RT-PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng RT-PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho dịch RNA tách chiết vào từng tube RT-PCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy PCR.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy PCR hoạt động theo hướng dẫn của bộ kit RT-PCR.
- Cho máy PCR chạy chương trình.

2.4 Chạy phản ứng Real-time PCR

- Bật máy real-time PCR 15 phút trước khi cho máy chạy. Bật máy tính và khởi động chương trình real-time PCR.
- Thực hiện bước mix với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng -, các nồng độ standard, dịch DNA vừa tách (hoặc dịch cDNA vừa thu nhận được (hoặc RNA vừa tách được nếu kit Real-time PCR có chứa phản ứng RT-PCR)) vào từng tube Real-time PCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu cho mẫu, chứng dương, chứng âm, standart theo hướng dẫn của bộ kit sử dụng
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Nhận định kết quả qua phân tích của máy dựa trên cơ sở hướng dẫn của bộ kit Real-time PCR được sử dụng.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường
- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế hoặc do máy Real-time PCR bị hỏng.
- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật.

36. Virus giải trình tự gen

I. NGUYÊN LÝ

Định danh virus bằng kỹ thuật xác định trình tự nucleotide của gen đặc trưng.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh hoặc chuyên ngành tương đương (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất

2.3 Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ thao tác PCR (PCR Workstation)
- Máy PCR
- Hệ thống điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Pipette
- Tủ đông sâu (-20°C và -70°C)
- Máy vi tính và phần mềm phân tích trình tự

2.4 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | kg |
| 2 | Cồn | ml |
| 3 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 4 | Panh | Cái |
| 5 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 6 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 7 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Cái |
| 9 | PCR master mix | Test |
| 10 | Men Polymerase hoặc Taq Polymerase | ml |

| | | |
|----|-----------------------------------------------------------|------|
| 11 | Khẩu hao sinh phẩm cho chẩn đoán và kiểm tra chất lượng | Test |
| 12 | Kit tách chiết ADN/ARN | Test |
| 13 | Kit tinh sạch DNA sau PCR | Test |
| 14 | Kit tinh sạch sản phẩm sau nhuộm màu (sau PCR sequencing) | Test |
| 15 | DNA marker | Bộ |
| 16 | Primer 1 (primer đặc hiệu) | ml |
| 17 | Primer 2 (primer đặc hiệu) | ml |
| 18 | Primer 3 (primer đặc hiệu) | ml |
| 19 | Primer 4 (primer đặc hiệu) | ml |
| 20 | Kit nhuộm màu trình tự (Big dye) – PCR sequencing | Test |
| 21 | Plate/tube cho máy đọc trình tự | Cái |
| 22 | Gel điện di cho máy đọc trình tự | Gram |
| 23 | Cartridge cho máy đọc trình tự | Test |
| 24 | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 25 | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 26 | Đầu côn 10 ul có lọc | Cái |
| 27 | Đầu côn 30 ul có lọc | Cái |
| 28 | Đầu côn 200 ul có lọc | Cái |
| 29 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 30 | Ethanol BDH | ml |
| 31 | Water-DEPC Treated | ml |
| 32 | Giấy thấm | Cuộn |
| 33 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 34 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 35 | Bút viết kính | Cái |
| 36 | Bút bi | Cái |
| 37 | Mũ | Cái |
| 38 | Khẩu trang | Cái |
| 39 | Găng tay | Đôi |
| 40 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |

| | | |
|----|-------------------------|-----|
| 41 | Quần áo | Bộ |
| 42 | Dung dịch nước rửa tay | ml |
| 43 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 44 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 45 | Khăn lau tay | cái |

3. Bệnh phẩm

Bệnh phẩm cơ thể có chứa căn nguyên virus nghi ngờ

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1 Tách chiết DNA/RNA tổng số

2.2 Thực hiện PCR

2.3 Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4 Giải trình tự gen

2.5 Kiểm tra và so sánh trình tự gen trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

3. Thời gian thực hiện: 2 - 5 ngày

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Sản phẩm PCR phải có một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét và không bị đứt gãy. Trình tự ADN của gen đích không bị nhiễu và phải có độ tương đồng $\geq 90\%$ mới có thể kết luận được.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Trong trường hợp không có sản phẩm PCR, cần phải kiểm tra lại quá trình tách chiết DNA tổng số, chất lượng của primers và master mix, và thực hiện lại toàn bộ xét nghiệm.

- Nếu trình tự DNA bị nhiễu cần phải kiểm tra lại độ đặc hiệu của sản phẩm PCR hoặc quá trình chạy PCR sequencing bị nhiễm chéo.

37. HBsAb test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể kháng virus viêm gan B trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh HBsAb (anti HBs) dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch để xác định định tính kháng thể kháng virus Viêm gan B.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Pipet đơn kênh thể tích từ 20µl đến 200µl

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất | Test |

| | | |
|----|------------------------------------|------|
| | lượng | |
| 11 | Đầu côn 20-200 µl | Cái |
| 12 | Giấy thấm | Cuộn |
| 13 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 14 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Bút viết kính | Cái |
| 16 | Bút bi | Cái |
| 17 | Mũ | Cái |
| 18 | Khẩu trang | Cái |
| 19 | Găng tay | Đôi |
| 20 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 21 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 22 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 25 | Khăn lau tay | Cái |
| 26 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

3. Bệnh phẩm:

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Huyết thanh hoặc huyết tương. Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

Bộ sinh phẩm SD Bioline Anti HBs (VD hoặc tương đương)

- Để sinh phẩm ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm.
- Lấy que xét nghiệm ra khỏi bao nhôm đặt lên bề mặt phẳng. Nhỏ 100 µl huyết thanh hoặc huyết tương vào giếng nhỏ mẫu bệnh phẩm.
- Chờ cho đến khi các vạch đỏ xuất hiện trên kit thử. Đọc kết quả trong vòng 20 phút. Không sử dụng kết quả quá 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ tía: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

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

Lưu ý: Độ đậm màu đỏ của vạch kết quả T sẽ khác nhau phụ thuộc vào nồng độ HBsAb có trong bệnh phẩm. Vì vậy, bất cứ độ mờ nào xuất hiện ở vạch kết quả T đều được coi là dương tính.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

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

2. Xử trí

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

38. HBcAb test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện HBcAb trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh HBcAb là dụng cụ xét nghiệm sắc ký miễn dịch định tính dựa trên nguyên lý phản ứng cạnh tranh.

II. CHUẨN BỊ

- Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Pipet đơn kênh thể tích từ 20 μ l đến 200 μ l

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |

| | | |
|----|------------------------------------|------|
| 11 | Đầu côn 20-200 µl | Cái |
| 12 | Giấy thấm | Cuộn |
| 13 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 14 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Bút viết kính | Cái |
| 16 | Bút bi | Cái |
| 17 | Mũ | Cái |
| 18 | Khẩu trang | Cái |
| 19 | Găng tay | Đôi |
| 20 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 21 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 22 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 25 | Khăn lau tay | Cái |
| 26 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

3. Bệnh phẩm:

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

- Lấy kit thử ra khỏi túi kín đựng sản phẩm và sử dụng kit thử càng nhanh càng tốt. Để đạt kết quả tốt nhất, toàn bộ quá trình xét nghiệm phải được hoàn thành trong vòng 1 giờ kể từ khi mở túi đựng sản phẩm.

- Đặt kit thử trên mặt phẳng sạch nằm ngang. Giữ ống nhỏ giọt theo phương thẳng đứng và nhỏ 3 giọt mẫu huyết thanh hoặc huyết tương (khoảng 75 µl) vào “Vùng nhỏ mẫu” (S) của kit thử và bắt đầu tính thời gian.

- Chờ cho đến khi các vạch đỏ xuất hiện trên kit thử. Đọc kết quả trong vòng 15 phút. Không sử dụng kết quả quá 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu tím đỏ: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|----------------------------------------------|----------------|
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu tím đỏ | Âm tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (kiểm tra C) | Dương tính |
| Trên thanh thử không xuất hiện vạch C | Test hỏng |

Lưu ý: Độ đậm nhạt trên **vạch kết quả (T)** có thể khác nhau. Nhưng bất cứ độ mờ nào có ở **vạch kết quả (T)** thì cũng được coi là **Âm tính**

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).
- Tách huyết thanh hoặc huyết tương càng nhanh càng tốt để tránh hiện tượng tan huyết (hemolysis).
- Chỉ được dùng các mẫu phẩm sạch, không bị hiện tượng tan huyết (nonhemolyzed). f
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu huyết thanh và huyết tương có thể bảo quản ở nhiệt độ 2°C -8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn (-20°C)

39. HBeAg test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên e của virus viêm gan B trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh HBeAg dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch, pha rắn, kiểu “Sandwich” 2 lớp để phát hiện định tính HBeAg.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Pipet đơn kênh thể tích từ 20µl đến 200µl

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Còn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất | Test |

| | | |
|----|------------------------------------|------|
| | lượng | |
| 11 | Đầu cân 20-200 µl | Cái |
| 12 | Giấy thấm | Cuộn |
| 13 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 14 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Bút viết kính | Cái |
| 16 | Bút bi | Cái |
| 17 | Mũ | Cái |
| 18 | Khẩu trang | Cái |
| 19 | Găng tay | Đôi |
| 20 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 21 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 22 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 25 | Khăn lau tay | Cái |
| 26 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

3. Bệnh phẩm:

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

Bộ sinh phẩm SD Bioline HBeAg (VD hoặc tương đương)

- Để sinh phẩm ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm.
- Lấy que xét nghiệm ra khỏi bao nhôm đặt lên bề mặt phẳng. Nhỏ 100 µl huyết thanh hoặc huyết tương vào giếng nhỏ mẫu bệnh phẩm.
- Đọc kết quả trong vòng 5 - 20 phút. Không đọc kết quả sau 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

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

Lưu ý: Độ đậm màu đỏ của **vạch kết quả T** sẽ khác nhau phụ thuộc vào nồng độ HBeAg có trong bệnh phẩm. Vì vậy, bất cứ độ mờ nào xuất hiện ở **vạch kết quả T** đều được coi là **Dương tính**.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).
- Tách huyết thanh hoặc huyết tương càng nhanh càng tốt để tránh hiện tượng tan huyết (hemolysis).
- Chỉ được dùng các mẫu phẩm sạch, không bị hiện tượng tan huyết (nonhemolyzed).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu huyết thanh và huyết tương có thể bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn (-20°C)

40. HBeAb test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nhanh HBeAb có trong mẫu bệnh phẩm huyết thanh hoặc huyết tương của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh HBeAb dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch in vitro để xác định tính kháng thể kháng HBe.

II. CHUẨN BỊ

3. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyên bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |

| | | |
|----|------------------------------------|------|
| 11 | Đầu côn 20-200 µl | Cái |
| 12 | Giấy thấm | Cuộn |
| 13 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 14 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Bút viết kính | Cái |
| 16 | Bút bi | Cái |
| 17 | Mũ | Cái |
| 18 | Khẩu trang | Cái |
| 19 | Găng tay | Đôi |
| 20 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 21 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 22 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 25 | Khăn lau tay | Cái |
| 26 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

3. Bệnh phẩm:

Huyết tương hoặc huyết thanh

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

- Lấy kit thử ra khỏi túi kín đựng sản phẩm và sử dụng kit thử càng nhanh càng tốt. Để đạt kết quả tốt nhất, toàn bộ quá trình xét nghiệm phải được hoàn thành trong vòng 1 giờ kể từ khi mở túi đựng sản phẩm.
- Đặt kit thử trên mặt phẳng sạch nằm ngang. Giữ ống nhỏ giọt theo phương thẳng đứng và nhỏ 3 giọt mẫu huyết thanh hoặc huyết tương (khoảng 75 µl) vào “Vùng nhỏ mẫu” (S) của kit thử và bắt đầu tính thời gian.
- Chờ cho đến khi các vạch đỏ xuất hiện trên kit thử. Đọc kết quả trong vòng 15 phút. Không sử dụng kết quả quá 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu tím đỏ: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|----------------------------------------------|------------|
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu tím đỏ | Âm tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (kiểm tra C) | Dương tính |
| Trên thanh thử không xuất hiện vạch C | Test hỏng |

Lưu ý: Nếu vạch control không chuyển sang màu tím đỏ test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).
- Tách huyết thanh hoặc huyết tương càng nhanh càng tốt để tránh hiện tượng tan huyết (hemolysis).
- Chỉ được dùng các mẫu phẩm sạch, không bị hiện tượng tan huyết (nonhemolyzed).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu huyết thanh và huyết tương có thể bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn (-20°C)

41. HBeAg định lượng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nồng độ kháng nguyên HBeAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật CMIA (miễn dịch vi hạt hóa phát quang) (VD hoặc tương đương)

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20⁰C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Micropipette thể tích 50 µl - 200 µl

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

Bộ sinh phẩm Architect HBeAg; Architect HBeAg Quantitative Calibrator; Architect HBeAg Quantitative Control - Abbott , hệ thống máy miễn dịch Architect (VD hoặc tương đương)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 5 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn | Test |
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất | Test |

| | | |
|----|------------------------------------------------------------------------|-------|
| | lượng | |
| 7 | Reaction vessels | Cái |
| 8 | Trigger solution | ml |
| 9 | Pre-Trigger Solution | ml |
| 10 | Concentrated Wash Buffer | ml |
| 11 | Septum | Cái |
| 12 | Probe conditioning solution (dùng được khoảng 2 tháng cho 1 máy i2000) | ml |
| 13 | Nước RO | ml |
| 14 | Sample cup | Chiếc |
| 15 | Giấy thấm | Cuộn |
| 16 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 18 | Bút viết kính | Cái |
| 19 | Bút bi | Cái |
| 20 | Mũ | Cái |
| 21 | Khẩu trang | Cái |
| 22 | Găng tay | Đôi |
| 23 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 24 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 25 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 26 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 27 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 28 | Khăn lau tay | Cái |
| 29 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu có)* | |

* Ghi chú: Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS)) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương của Người bệnh

4. Phiếu xét nghiệm: Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm: Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem phụ lục)

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Architect HBeAg; Architect HBeAg Quantitative Calibrator; Architect HBeAg Quantitative Control - Abbott (VD hoặc tương đương)

| Các bước | Nội dung |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests |
| 2 | <ul style="list-style-type: none"> - Vào Reagent để kiểm tra xem có cần chạy hiệu chuẩn không. Những trường hợp sau cần phải chạy chuẩn: <ul style="list-style-type: none"> + Thay lô hóa chất mới. + Khi chạy chứng HBeAg Quantitative Control thấy kết quả vượt ra ngoài dải giới hạn cho phép. + Khi lần chạy chuẩn trước > 30 ngày mặc dù vẫn cùng lô hóa chất cũ. - Chạy chuẩn ở 6 nồng độ từ A đến F. Mỗi nồng độ phải chạy 2 lần. |
| 3 | Sau khi kiểm tra và hoàn tất các bước trên thì tiến hành chạy chứng HBeAg Quantitative Control 3 mức: thấp, trung bình và cao. |
| Chạy mẫu theo các bước sau | |
| 1 | Chuẩn bị bệnh phẩm: Ly tâm máu Người bệnh 3000 vòng trong 10 phút. |
| | Nếu chạy mẫu không dùng barcode: |
| 2 | Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút 200 µl huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng. |
| 3 | Vào màn hình Patient Order → Single Patient . |
| 4 | Nhập <ul style="list-style-type: none"> - C/P: vị trí mẫu trên khay/ mã khay chứa mẫu - SID: mã số Người bệnh |
| 5 | Chọn tên test là HbeAg |
| 6 | Chọn Sample details để nhập thêm thông tin Người bệnh (nếu cần) |
| 7 | Nhấn ADD ORDER (F3) . |
| 8 | Đưa khay mẫu vào khu nạp giá mẫu ở vị trí chạy mẫu Người bệnh thường quy. |

| | |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9 | <p>Khởi động chạy RUN</p> <ul style="list-style-type: none"> - Trên màn hình chính, chọn SH & PM - Nhấn RUN (F8) |
| Chạy mẫu có barcode | |
| 1 | Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm Labconn |
| 2 | Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu |
| 3 | Nhấn RUN (F8) |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng dương thấp, trung bình và cao trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định như bảng dưới đây:

| Mẫu chứng dương | Nồng độ (IU/ml) | Khoảng dao động (IU/ml) |
|------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Chứng dương thấp | 1,3 | 0,78 – 1,82 |
| Chứng dương trung bình | 100 | 60 – 140 |
| Chứng dương cao | 480 | 288 – 672 |

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có).

3. Kết quả và báo cáo

- Tính toán kết quả của đường chuẩn: Máy sẽ tự động tính toán tín hiệu hóa phát quang trung bình của các đường chuẩn từ A đến F để tạo nên đường cong chuẩn và lưu lại kết quả trên hệ thống.
- Mẫu bệnh phẩm: Khi kết hợp thử nghiệm Architect HBeAg với Architect HBeAg Quantitative Calibration sử dụng đường chuẩn 4 điểm phù hợp với phương pháp giảm dữ liệu (4PLC-Y weigh) để tạo ra một đường cong chuẩn. Máy sẽ tự động tính toán giá trị của mẫu bệnh phẩm dựa trên đường cong chuẩn. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được đánh giá dựa trên chỉ số của mẫu chuẩn:

| Mẫu chuẩn | Nồng độ (IU/ml) |
|------------------|------------------------|
| Cal A | 0 |
| Cal B | 0,7 |
| Cal C | 1,5 |

| | |
|-------|-----|
| Cal D | 10 |
| Cal E | 150 |
| Cal F | 700 |

+ Nếu mẫu bệnh phẩm có giá trị HBeAg > 700 IU/ml thì cần phải pha loãng mẫu tự động hoặc thủ công theo tỷ lệ 1:10.

- Pha loãng tự động: Máy tự động pha loãng bệnh phẩm 1:10 rồi tính toán và báo cáo kết quả tự động.

- Pha loãng thủ công: Sau khi pha loãng phải nhập hệ số pha loãng vào màn hình Người bệnh hoặc chứng. Hệ thống sẽ sử dụng hệ số pha loãng này để tự động tính toán và báo cáo kết quả.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Máy sẽ báo sample short (bệnh phẩm đông hoặc không đủ)→ Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup (thực hiện theo đúng yêu cầu của lấy mẫu xét nghiệm Vi sinh)

- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.

- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).

42. HAV Ab test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể kháng HAV có trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần của người.

3. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh HAV Ab dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch để xác định định tính kháng thể IgM/IgG kháng virus Viêm gan A.

II. CHUẨN BỊ

4. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyên bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |

| | | |
|----|----------------------------|------|
| 11 | Đầu côn 20-200 µl | Cái |
| 12 | Giấy thấm | Cuộn |
| 13 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 14 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Bút viết kính | Cái |
| 16 | Bút bi | Cái |
| 17 | Mũ | Cái |
| 18 | Khẩu trang | Cái |
| 19 | Găng tay | Đôi |
| 20 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 21 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 22 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch khử trùng | ml |

3. Bệnh phẩm:

Huyết tương hoặc huyết thanh

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

Bộ sinh phẩm SD Bioline HAV IgM/IgG (VD hoặc tương đương)

- Lấy dụng cụ xét nghiệm ra khỏi túi đựng và đặt lên bề mặt khô, phẳng.
- Dùng pipet vi lượng được cung cấp sẵn, hút bệnh phẩm đến vạch màu đen (5µl) nhỏ vào giếng mẫu thử (S).
- Nhỏ thêm 4 giọt dung môi vào trong giếng hình tròn ở đầu thanh thử.
- Ngay sau khi nhỏ mẫu thử, sẽ thấy màu tím di chuyển ngang cửa sổ kết quả nằm ở chính giữa dụng cụ xét nghiệm.
- Đọc kết quả trong vòng 15-20 phút.

* Chú ý: Không đọc kết quả sau 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ hoặc hồng: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu tím tương ứng với vạch M và C | Dương tính với IgM |
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu tím tương ứng với vạch G và C | Dương tính với IgG |
| Trên thanh thử xuất hiện 3 vạch màu tím tương ứng với vạch M, G và C | Dương tính với IgM, IgG |
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (kiểm tra C) | Âm tính |
| Trên thanh thử không xuất hiện vạch C | Test hỏng |

Lưu ý: Nếu vạch control không chuyển sang màu tím, test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).
- Tách huyết thanh hoặc huyết tương càng nhanh càng tốt để tránh hiện tượng tan huyết (hemolysis).
- Chỉ được dùng các mẫu phẩm sạch, không bị hiện tượng tan huyết (nonhemolyzed).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu huyết thanh và huyết tương có thể bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn -20°C.

43. HCV Ab test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể kháng HCV có trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh HCV Ab dựa trên nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch để xác định định tính kháng thể kháng virus Viêm gan C.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4°C - 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |

| | | |
|----|----------------------------|------|
| 11 | Đầu côn 20-200 µl | Cái |
| 12 | Giấy thấm | Cuộn |
| 13 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 14 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Bút viết kính | Cái |
| 16 | Bút bi | Cái |
| 17 | Mũ | Cái |
| 18 | Khẩu trang | Cái |
| 19 | Găng tay | Đôi |
| 20 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 21 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 22 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch khử trùng | ml |

3. Bệnh phẩm:

Huyết tương hoặc huyết thanh

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

Bộ sinh phẩm SD Bioline Anti HCV (VD)

- Lấy dụng cụ xét nghiệm ra khỏi túi đựng và đặt lên bề mặt khô, phẳng.
- Dùng pipet vi lượng, nhỏ 10µl huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần vào giếng mẫu thử (S).
- Nhỏ thêm 4 giọt dung môi vào trong giếng mẫu thử.
- Ngay sau khi nhỏ mẫu thử, sẽ thấy màu tím di chuyển ngang cửa sổ kết quả nằm ở chính giữa dụng cụ xét nghiệm.
- Đọc kết quả trong vòng 5-20 phút.

* Chú ý: Không đọc kết quả sau 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ hoặc hồng: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|----------------------------------------------|----------------|
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu tím | Dương tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (kiểm tra C) | Âm tính |
| Trên thanh thử không xuất hiện vạch C | Test hỏng |

Lưu ý: Nếu vạch control không chuyển sang màu tím xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).
- Tách huyết thanh hoặc huyết tương càng nhanh càng tốt để tránh hiện tượng tan huyết (hemolysis).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu huyết thanh và huyết tương có thể bảo quản ở nhiệt độ 2°C -8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn (-20°C).

44. HEV IgG miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định kháng thể IgG kháng virus viêm gan E trong huyết thanh và huyết tương người.

2. Nguyên lý

Xác định kháng thể IgG kháng virus viêm gan E dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Pipet đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l .
- Micropipette

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| ST T | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Chứng ngoại kiểm âm (nếu có) | ml |
| 12 | Chứng ngoại kiểm dương (nếu có) | ml |
| 13 | Nước cất | ml |
| 14 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 15 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 16 | Giấy thấm | Cuộn |
| 17 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 18 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 19 | Bút viết kính | Cái |
| 20 | Bút bi | Cái |
| 21 | Mũ | Cái |
| 22 | Khẩu trang | Cái |
| 23 | Găng tay | Đôi |
| 24 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 25 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 26 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 27 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 28 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 29 | Khăn lau tay | Cái |
| 30 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

VD: Bộ kit EVG.CE_HEV IgG (Diapro) (VD hoặc tương đương)

| Các bước | Nội dung |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm |
| 2 | Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự. |
| 3 | Chuẩn bị dung dịch rửa. |
| 4 | Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm. |
| 5 | Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá. |
| 6 | Cho 200 µl chứng âm cho vào ba giếng, 200 µl bộ định chuẩn vào hai giếng, 200 µl chứng dương cho kháng nguyên vào một giếng. Không pha loãng chứng và bộ định chuẩn |
| 7 | Cho 200 µl dung dịch pha loãng mẫu vào trong các giếng mẫu sau đó cho 10ul mẫu vào mỗi giếng xác định. Trộn đều các giếng (tránh chảy tràn giữa các giếng) để phân tán mẫu vào dung dịch pha loãng của nó. |
| 8 | Cho 50 µl Dung dịch pha loãng xét nghiệm vào trong tất cả các giếng chứng/ bộ định chuẩn và các giếng mẫu. Kiểm tra bằng mắt thường các giếng mẫu chuyển sang màu xanh tối |
| 8 | Đậy nắp và ủ. |
| 9 | Rửa phiên nhựa. |
| 10 | Chuẩn bị chất cộng hợp. Nhỏ 100 µl cộng hợp vào mỗi giếng |
| 11 | Đậy nắp và ủ |
| 12 | Rửa phiên nhựa |
| 13 | Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng |
| 14 | Ủ phiên nhựa, không đậy nắp và tránh ánh sáng |
| 15 | Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng |
| 16 | Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620 nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng. |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- OD chứng âm < 0,05.

- OD chứng dương > 1
- OD giếng trống < 0.1

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

2. Tính giá trị ngưỡng:

Cut-off (CO) = Trung bình chứng âm + 0,35.

3. Diễn giải kết quả: Dựa trên tỷ lệ của OD mẫu bệnh phẩm/CO

- Dương tính: nếu tỷ lệ > 1,1
- Nghi ngờ: nếu tỷ lệ nằm trong khoảng 0,9 - 1
- Âm tính: nếu tỷ lệ < 0,9

Nếu kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm sau lần xét nghiệm đầu tiên 1 đến 2 tuần.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

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

Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

45. Dengue virus IgA test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nhanh kháng thể IgA của virus Dengue trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh kháng thể IgA của virus Dengue dựa trên nguyên lý kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Đầu côn 20-200 µl | Cái |

| | | |
|----|------------------------------------|------|
| 12 | Giấy thấm | Cuộn |
| 13 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 14 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Bút viết kính | Cái |
| 16 | Bút bi | Cái |
| 17 | Mũ | Cái |
| 18 | Khẩu trang | Cái |
| 19 | Găng tay | Đôi |
| 20 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 21 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 22 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 25 | Khăn lau tay | Cái |
| 26 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

3. Bệnh phẩm:

Huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất được ví dụ ở trên. Bộ sinh phẩm Assure Dengue IgA Rapid Test (MP) (VD).

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên Người bệnh trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Cho 25 µl bệnh phẩm vào giếng số 1 (giếng nhỏ bệnh phẩm hình vuông).
- Khi bệnh phẩm thấm tới vạch chỉ thị màu xanh, nhỏ 3 giọt dung dịch đệm vào giếng số 2 hình oval
- Kéo miếng mi ca mỏng có đánh dấu chữ “Dengue IgA” ở đầu thanh thử cho đến khi cảm thấy có lực cản không kéo được nữa thì nhỏ 1 giọt dung dịch đệm vào giếng nhỏ bệnh phẩm.

- Đọc kết quả trong vòng 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 1 hoặc 2 vạch màu đỏ hoặc hồng: C là vạch kiểm tra (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line).

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|--------------------------------------------------------------|------------|
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu đỏ hoặc hồng (cả C và T) | Dương tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch (kiểm tra C) | Âm tính |
| Trên thanh thử không xuất hiện vạch C | Test hỏng |

Lưu ý: Nếu vạch control không chuyển sang màu đỏ hay màu hồng test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).
- Tách huyết thanh hoặc huyết tương càng nhanh càng tốt để tránh hiện tượng tan huyết (hemolysis).
- Chỉ được dùng các mẫu phẩm sạch, không bị hiện tượng tan huyết (nonhemolyzed).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu huyết thanh và huyết tương có thể bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn -20°C.

46. Dengue virus NS1Ag miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên NS1 của virus Dengue trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) gián tiếp (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Các pipet đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l .
- Micropipette

2.2 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 21 | Găng tay | Đôi |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

| Các bước | Nội dung |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm |
| 2 | Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự. |
| 3 | Chuẩn bị dung dịch rửa. |
| 4 | Pha loãng chủng và mẫu bệnh phẩm. |
| 5 | Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá. |
| 6 | Rửa các giếng 1 lần bằng dung dịch rửa đã pha loãng. |
| 7 | Cho chủng và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của qui trình. |
| 8 | Đậy tấm và ủ. |
| 9 | Rửa phiến nhựa. |
| 10 | Chuẩn bị chất cộng hợp |
| 11 | Đậy tấm và ủ |
| 12 | Rửa phiến nhựa |
| 13 | Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng |
| 14 | Ủ phiến nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng |
| 15 | Nhỏ dung dịch dừng phản ứng |
| 16 | Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng. |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chủng ngưỡng: $OD > 0,2$.
- Chủng âm: Tỷ số OD chủng âm/OD chủng ngưỡng $< 0,4$.
- Chủng dương: Tỷ số OD chủng dương/OD chủng ngưỡng $> 1,5$

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

2. Tính giá trị ngưỡng:

Cut-off (CO) = Giá trị trung bình của các cut-off

- Tính tỷ số mẫu:

Tỷ số mẫu = giá trị OD của mẫu/OD của ngưỡng

3. Diễn giải kết quả

- Dương tính: khi tỷ số mẫu > 1
- Nghi ngờ: nếu $0,5 \leq$ tỷ số mẫu $< 1 \rightarrow$ cần xét nghiệm lại.
- Âm tính: khi tỷ số mẫu $< 0,5$

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

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

Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

47. Dengue Virus Real-time RT-PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện RNA đặc trưng của virus Dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

2. Nguyên lý

Xác định sự có mặt của gen đặc trưng sử dụng các cặp mồi và probe cho virus Dengue bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ thao tác PCR
- Máy Real-time PCR và hệ thống máy vi tính
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm lạnh dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette 10 – 1000 μ l.

2.2. Hóa chất, sinh phẩm và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| TT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|----|-----------------------------------|--------|
| 1. | Bơm kim tiêm | Cái |
| 2. | Panh | Cái |
| 3. | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|-----|----------------------------------------------------------|------|
| 4. | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Hộp |
| 5. | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 6. | Găng không bột | Cái |
| 7. | Master Mix | Test |
| 8. | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng | Test |
| 9. | Kit tách RNA | Test |
| 10. | Primer 1 và 2 * | ml |
| 11. | Probe * | ml |
| 12. | Ethanol BDH | ml |
| 13. | Water-DEPC Treated | ml |
| 14. | Sodium hypochlorite | ml |
| 15. | RNase AWAY™ Decontamination Reagent | ml |
| 16. | Ống Eppendorf 1,5 ml | Tube |
| 17. | Ống Eppendorf 0,2 ml | Tube |
| 18. | Đầu côn 10 µl có lọc | Cái |
| 19. | Đầu côn 20 µl | Cái |
| 20. | Đầu côn 200 µl có lọc | Cái |
| 21. | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 22. | Bộ pipetman (5 chiếc) | Bộ |
| 23. | Giấy thấm | Cuộn |
| 24. | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 25. | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 26. | Bút viết kính | Cái |
| 27. | Bút bi | Cái |
| 28. | Mũ | Cái |
| 29. | Khẩu trang | Cái |
| 30. | Găng tay | Đôi |
| 31. | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 32. | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 33. | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 34. | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |

| | | |
|-----|-----------------------|-----|
| 35. | Dung dịch khử trùng | ml |
| 36. | Khăn lau tay | cái |
| 37. | Ngoại kiểm (nếu có)** | |

** Ghi chú:

Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện Real-time RT-PCR

- Thực hiện bước này với các tube qPCR mix được giữ trong khay giữ lạnh hoặc trên đá vảy.
- Chỉ lấy đủ số tube qPCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng qPCR phải spin down nhanh tube qPCR để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube
- Chuẩn bị các thành phần của phản ứng Real-time RT-PCR
- Thêm 5 µl của mẫu RNA, chứng dương hoặc chứng âm vào từng tube qPCR đã gồm đầy đủ các thành phần.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR
- Cài đặt vị trí mẫu trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Đọc kết quả ở bước sóng 530 (kênh màu FAM)

| Các trường hợp | Chu kỳ (Ct) | Nhận định kết quả |
|----------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | Không tín hiệu | Dưới giới hạn phát hiện hoặc âm tính |
| 2 | Tín hiệu xuất hiện < 38 chu kỳ | Dương tính |

| | | |
|---|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 3 | Tín hiệu xuất hiện trong khoảng 38-45 chu kỳ | Chạy lại, nếu vẫn 38-45c, kết quả là Dưới giới hạn phát hiện. |
|---|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|

V. NHỮNG LƯU Ý VÀ XỬ TRÍ

- Đọc kỹ hướng dẫn qui trình xét nghiệm trước khi thực hiện.
- Bảo quản bộ kit theo đúng hướng dẫn theo hướng dẫn của nhà sản xuất, riêng thành phần mẫu chứng dương nên giữ ở -80° C cho bảo quản lâu dài.
- Khu vực tách RNA, mix phản ứng qPCR phải được bố trí biệt lập và khử trùng bề mặt bằng dung dịch sodium hypochloride 0,5%, dụng cụ sau sử dụng phải rửa kỹ dưới vòi nước với xà phòng, sau đó lau lại bằng dung dịch RNase AWAY™ Decontamination Reagent; chiếu tia tử ngoại khi trước và sau khi thao tác để tránh nhiễm chéo.
- Quá trình mix thực hiện trên đá vẩy hoặc PCR cooler, thực hiện chạy Real-time-PCR ngay sau khi mix xong phản ứng.
- Trong trường hợp mẫu chứng dương và mẫu chứng âm xuất hiện không đúng với diễn giải ở phần IV thì phải kiểm tra lại Master mix, chứng dương và quá trình tách RNA tổng số, thực hiện lại toàn bộ xét nghiệm.

48. HSV 2 IgG miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG của virus HSV 2 trong mẫu bệnh phẩm huyết thanh hoặc huyết tương người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý điện hóa phát quang điện để phát hiện kháng thể IgG của virus HSV 2

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy ly tâm thu huyết thanh
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Các Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l

2.3 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 21 | Găng tay | Đôi |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị sinh phẩm
- Chuẩn bị mẫu huyết thanh
- Chuẩn bị standards và các chứng
- Nhỏ chứng và bệnh phẩm theo thứ tự hướng dẫn
- Đưa kit vào máy chạy theo hướng dẫn
- Quá trình thực hiện hoàn toàn tự động trên máy trong vòng 25 phút
- Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Nhận định kết quả qua phân tích của máy dựa trên cơ sở hướng dẫn của bộ kit
- Nếu kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm sau lần xét nghiệm đầu tiên 15 - 20 ngày.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

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

2. Xử trí

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

Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

49. EBV IgG miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG của virus EBV trong mẫu bệnh phẩm huyết thanh hoặc huyết tương của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý điện hóa phát quang điện để phát hiện kháng thể IgG của virus EBV trong mẫu huyết thanh.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Máy ly tâm thu huyết thanh
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Các Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 21 | Găng tay | Đôi |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị sinh phẩm
- Chuẩn bị mẫu huyết thanh
- Chuẩn bị standards và các chứng
- Nhỏ chứng và bệnh phẩm theo thứ tự hướng dẫn
- Đưa kit vào máy chạy theo hướng dẫn
- Quá trình thực hiện hoàn toàn tự động trên máy trong vòng 25 phút
- Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Nhận định kết quả qua phân tích của máy dựa trên cơ sở hướng dẫn của bộ kit
- Nếu kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm sau lần xét nghiệm đầu tiên 15 - 20 ngày.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

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

2. Xử trí

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

Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

50. EV71 IgM/IgG test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nhanh, định tính và phân biệt kháng thể IgM và IgG kháng Enterovirus 71 có trong huyết thanh hoặc huyết tương của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh EV71 IgM/IgG dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch in vitro để xác định định tính kháng thể IgM/IgG kháng Enterovirus 71.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bộ Kit làm xét nghiệm | test |
| 2 | Micropipette 1 – 20 µl | cái |
| 3 | Đầu côn 1-20 µl | cái |
| 4 | Bông | Kg |
| 5 | Còn 90° (vệ sinh dụng cụ) | ml |
| 6 | Đèn cồn | Cái |
| 7 | Panh | Cái |
| 8 | Bơm kim tiêm | cái |
| 9 | Garô | cái |
| 10 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 11 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|-----------------------------|-----|
| 12 | Mũ | Cái |
| 13 | Khẩu trang | Cái |
| 14 | Găng tay | Đôi |
| 15 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 16 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 17 | Ống nghiệm thủy tinh | Ống |
| 18 | Bút viết kính | Cái |
| 19 | Bút bi | Cái |
| 20 | Bật lửa | Cái |
| 21 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 22 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 23 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 24 | Khăn lau tay | Cái |
| 25 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | Tờ |

3. Bệnh phẩm:

Huyết tương hoặc huyết thanh

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên Người bệnh trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Cho 5 µl huyết thanh/ huyết tương vào giếng S.
- Nhỏ 3 giọt (~100 µl) dung dịch đệm vào giếng dung môi hình tròn.
- Đọc kết quả trong vòng 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử có 3 điểm: C là vạch kiểm tra (Control line), M là vạch thử nghiệm kháng thể IgM, G là vạch thử nghiệm kháng thể IgG.

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|----------------------------------------------------|--------------------|
| Trên thanh thử xuất hiện 1 vạch vị trí C | Âm tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch vị trí C và M | IgM Dương tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch vị trí C và G | IgG Dương tính |
| Trên thanh thử xuất hiện 3 vạch vị trí C và M và G | IgG/IgM Dương tính |

Lưu ý: Trong bất kỳ trường hợp nào khác mà vạch control không chuyển sang màu đỏ hay màu hồng test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).
- Tách huyết thanh hoặc huyết tương càng nhanh càng tốt để tránh hiện tượng tan huyết (hemolysis).
- Chỉ được dùng các mẫu phẩm sạch, không bị hiện tượng tan huyết (nonhemolyzed).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu huyết thanh và huyết tương có thể bảo quản ở nhiệt độ 2°C -8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn (-20°C).

51. BK virus đo tải lượng Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện và đo số bản sao của virus BK trong dịch não tủy, huyết tương, máu toàn phần hoặc nước tiểu của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Máy tách chiết acid nucleic.
- Bộ lưu điện.
- Máy ủ nhiệt.
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm lạnh ≥ 12000 gpm/phút
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ $0,5 \mu\text{l} - 1000 \mu\text{l}$.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Tube đựng bệnh phẩm 5 ml | Cái |
| 4 | Cryotube (lưu mẫu dương tính) | Cái |
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------------------|-------|
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm cho mẫu chứng, mẫu chuẩn và kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | PCR-Tube 0,1 ml | Cái |
| 8 | Hóa chất và VTTH cho tách chiết trên MPLC | Test |
| 9 | Tube eppendorf 1,7 ml | Cái |
| 10 | Đầu Pipét có lọc 1000 ul | Cái |
| 11 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 12 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 13 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Quyển |
| 14 | Bút viết kính | Cái |
| 15 | Bút bi | Cái |
| 16 | Mũ giấy | Cái |
| 17 | Khẩu trang | Cái |
| 18 | Găng không có bột tal | Đôi |
| 19 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 20 | Quần áo | Bộ |
| 21 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 22 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 23 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 24 | Khăn lau tay | Cái |
| | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch não tủy, huyết tương, máu toàn phần và nước tiểu.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

BK virus PCR Kit (GeneProof – VD hoặc tương đương)

2.1 Thu nhận và xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết DNA nếu cần.

2.2 Tách chiết DNA:

Tách chiết bằng tay hoặc máy tự động.

2.3 Thực hiện phản ứng real-time PCR

Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.

- Bật máy real-time PCR. Bật máy tính khởi động chương trình real-time PCR trước khi chạy mẫu ít nhất 15 phút.

- Pha hóa chất:

+ Chuẩn bị đủ số tube PCR cần dùng

+ Cho 30 µl MasterMix vào mỗi tube

+ Nhỏ 10 µl mẫu DNA đã tách chiết từ bệnh phẩm hoặc mẫu chứng dương (gồm 4 nồng độ từ 10^1 đến 10^4), chứng âm vào các tube tương ứng. Tổng thể tích cuối cùng là 40 µl.

+ Ly tâm nhẹ ống rồi đặt vào máy real-time PCR theo vị trí đã cài đặt.

- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.

- Chọn màu FAM cho mẫu, chứng dương và chứng âm và HEX cho chứng nội.

- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động

- Lưu file dữ liệu vào máy tính

- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

+ Giá trị định lượng chấp nhận được nếu cả 3 chứng: chứng âm, chứng dương và chứng nội có nghĩa. Các chứng có giá như sau:

+ Chứng âm: không phát hiện.

+ Chứng dương: nằm trong khoảng cho phép của nhà sản xuất (đặc hiệu với từng lô thuốc thử).

+ Chứng nội: với chứng âm và mẫu không phát hiện phải có tín hiệu lên ứng với Ct < 38.

+ Ngược lại:

- Chứng âm: Nếu chứng âm không hợp lệ thì phải thực hiện lại xét nghiệm cả chứng và toàn bộ lô bệnh phẩm.
- Chứng dương: Nếu chứng dương không hợp lệ thì phải làm lại xét nghiệm toàn bộ mẻ chạy.
- + Chứng nội: không có tín hiệu lên với chứng âm và mẫu không phát hiện với Ct < 38 thì phải chạy lại mẫu đó.

2. Phân tích mẫu

Đo tải lượng virus (VL) được tính toán sử dụng công thức sau:

$$VL(\text{copies/ml}) = (SC \times EV)/IV$$

Trong đó:

VL = giá trị định lượng (copies/ml)

SC = nồng độ trong mẫu (sample concentration – cp/μl)

EV = thể tích thu mẫu (elution volume - μl)

IV = thể tích tách chiết (isolation volume - ml)

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. **Sự cố:** Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.
2. **Nguyên nhân:** Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.
3. **Khắc phục:** Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

52. Enterovirus Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt của RNA đặc trưng của *Enterovirus*

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học tối thiểu cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho ống bệnh phẩm 5ml
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Máy chạy Real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-------------------------------------------|--------|
| 1 | Tube đựng bệnh phẩm vô trùng | Tube |
| 2 | Găng không có bột tal (DNase-RNase free) | Đôi |
| 3 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Bộ kit chiết tách ARN tổng số | Hộp |
| 8 | Bộ kit tổng hợp cDNA (Nếu bộ kit chạy Real-time PCR không bao gồm RT-PCR) | Hộp |
| 9 | ống Falcon 50ml | Cái |
| 10 | Ependoff 1,7ml | Tube |
| 11 | Ependoff 0,2ml | Tube |
| 12 | Đầu côn 10 µl có lọc | Cái |
| 13 | Đầu côn 30 µl | Cái |
| 14 | Đầu côn 200 µl có lọc | Cái |
| 15 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 21 | Water-DEPC Treated | ml |
| 22 | Giấy thấm | Cuộn |
| 23 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 24 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 25 | Bút viết kính | Cái |
| 26 | Bút bi | Cái |
| 27 | Mũ | Cái |
| 28 | Khẩu trang | Cái |
| 29 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 30 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 31 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 32 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 33 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 34 | Khăn lau tay | Cái |
| 35 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch não tủy, dịch phế quản, dịch ty hầu, phân hoặc tăm bông phết trực tràng, các loại dịch cơ thể nghi ngờ nhiễm enterovirus

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu:

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết RNA nếu cần.

2.2. Tách chiết RNA từ bệnh phẩm bằng bộ kit tách RNA tổng số

2.3. Chạy phản ứng RT-PCR dùng môi ngẫu nhiên (Bỏ qua bước này nếu kit sử dụng real-time PCR có chứa luôn phản ứng RT-PCR)

- Bật máy PCR 15 phút trước khi chạy phản ứng RT-PCR
- Thực hiện bước này với các tube RT-PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube RT-PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng RT-PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho dịch RNA tách chiết vào từng tube RT-PCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy PCR.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy PCR hoạt động theo hướng dẫn của bộ kit RT-PCR.
 - Cho máy PCR chạy chương trình.

2.4 Chạy phản ứng Real-time PCR

- Bật máy real-time PCR 15 phút trước khi cho máy chạy. Bật máy tính và khởi động chương trình real-time PCR.
- Thực hiện bước mix với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube Real-time PCR Mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng -, các nồng độ standard, dịch cDNA vừa thu nhận được (hoặc RNA vừa tách được nếu kit Real-time PCR có chứa phản ứng RT-PCR) vào từng tube Real-time PCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.

- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu cho mẫu, chứng dương, chứng âm, standart theo hướng dẫn của bộ kit sử dụng
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Nhận định kết quả qua phân tích của máy dựa trên cơ sở hướng dẫn của bộ kit Real-time PCR được sử dụng.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- 1. Sự cố:** Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.
- 2. Nguyên nhân:** Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.
- 3. Khắc phục:** Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

53. Coronavirus Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt của RNA đặc trưng của *Coronavirus* trong mẫu bệnh phẩm của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học)..

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học tối thiểu cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho ống bệnh phẩm 5ml
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Máy chạy Real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Tấm bông vô trùng | Kg |
| 2 | Tube đựng bệnh phẩm vô trùng | Tube |

| | | |
|----|------------------------------------------------------------------------------|------|
| 3 | Găng không có bột tan (DNase-RNase free) | Cái |
| 4 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 5 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 6 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 7 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 8 | Bộ kit chiết tách RNA tổng số | Hộp |
| 9 | Bộ kit tổng hợp cDNA (Nếu bộ kit chạy Real-time PCR không bao gồm RT-PCR) | Hộp |
| 10 | Ngoại kiểm (nếu có)* | |
| 11 | ống Falcon 50ml | Cái |
| 12 | Ependoff 1,7ml | Tube |
| 13 | Ependoff 0,2ml | Tube |
| 14 | Đầu côn 10 µl có lọc | Cái |
| 15 | Đầu côn 30 µl | Cái |
| 21 | Đầu côn 200 µl có lọc | Cái |
| 22 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 23 | Water-DEPC Treated | ml |
| 24 | Giấy thấm | Cuộn |
| 25 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 26 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 27 | Bút viết kính | Cái |
| 28 | Bút bi | Cái |
| 29 | Mũ | Cái |
| 30 | Khẩu trang | Cái |
| 31 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 32 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 33 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 34 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 35 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 36 | Khăn lau tay | Cái |

| | | |
|----|------------------------------------|--|
| 37 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |
|----|------------------------------------|--|

* Ghi chú:

Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Chủ yếu là chất tiết đường hô hấp: Ngoáy họng, ngoáy mũi, dịch phế quản, dịch ty hầu, đờm. Ngoài ra còn có trong phân, máu, các loại dịch cơ thể nghi ngờ nhiễm coronavirus

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu:

- Với các loại dịch nhớt, nhầy, phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết RNA
- Với tăm bông ngoáy họng, ngoáy mũi, cho bệnh phẩm ở đầu tăm bông vào một tube vô trùng có chứa sẵn 0,5 ml nước Water-DEPC Treated, ngoáy vào thành ống tube ít nhất 05 lần cho bệnh phẩm hòa tan vào dung dịch. Sử dụng dung dịch này để tách chiết RNA.
- Bệnh phẩm đã được thuần nhất có thể lưu giữ ở -20°C trong 03 tháng nếu chưa được tách chiết.

2.2. Tách chiết RNA

2.3. Chạy phản ứng RT-PCR dùng môi ngẫu nhiên (Bỏ qua bước này nếu kit sử dụng real-time PCR có chứa luôn phản ứng RT-PCR)

- Bật máy PCR 15 phút trước khi chạy phản ứng RT-PCR
- Thực hiện bước này với các tube RT-PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube RT-PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng RT-PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho dịch RNA tách chiết vào từng tube RT-PCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy PCR.

- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy PCR hoạt động theo hướng dẫn của bộ kit RT-PCR.

Cho máy PCR chạy chương trình.

2.4 Chạy phản ứng Real-time PCR

- Bật máy real-time PCR 15 phút trước khi cho máy chạy. Bật máy tính và khởi động chương trình real-time PCR.
- Thực hiện bước mix với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube Real-time PCR Mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng -, các nồng độ standard, dịch cDNA vừa thu nhận được (hoặc RNA vừa tách được nếu kit Real-time PCR có chứa phản ứng RT-PCR) vào từng tube Real-time PCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu cho mẫu, chứng dương, chứng âm, standart theo hướng dẫn của bộ kit sử dụng
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính

Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Nhận định kết quả qua phân tích của máy dựa trên cơ sở hướng dẫn của bộ kit Real-time PCR được sử dụng.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- 1. Sự cố:** Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.
- 2. Nguyên nhân:** Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.
- 3. Khắc phục:** Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

54. Hantaan virus test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện định tính nhanh kháng thể IgM, IgG và IgA kháng Hantaan virus trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần của người.

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh kháng thể IgM, IgG và IgA kháng Hantaan virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh..

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyên bệnh phẩm | Test |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Đầu côn 200 µl | Cái |

| | | |
|----|----------------------------|------|
| 12 | Giấy thấm | Cuộn |
| 13 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 14 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Bút viết kính | Cái |
| 16 | Bút bi | Cái |
| 17 | Mũ | Cái |
| 18 | Khẩu trang | Cái |
| 19 | Găng tay | Đôi |
| 20 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 21 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 22 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 23 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 24 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 25 | Khăn lau tay | Cái |

3. Bệnh phẩm:

Huyết tương, huyết thanh hoặc máu toàn phần.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật: VD: Bộ sinh phẩm SD Bioline Hantaan virus.

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên Người bệnh trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Dùng pipette hút 20 µl máu toàn phần hoặc 10 µl mẫu huyết thanh hoặc huyết tương nhỏ vào giếng mẫu hình tròn “S”.
- Tiếp tục nhỏ 3-4 giọt dung môi thử nghiệm vào giếng mẫu “S”.
- Đọc kết quả trong khoảng 5 - 20 phút. Không được đọc kết quả sau 20 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử xuất hiện 2 vạch màu: C là vạch chứng (Control line), T là vạch thử nghiệm (Test line) hoặc chỉ có 1 vạch.

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|------------------------------------|------------------|
| Xuất hiện 2 vạch màu ở vùng C và T | Dương tính |
| Xuất hiện 1 vạch màu ở vùng C | Âm tính |
| Xuất hiện 1 vạch màu ở vùng T | Không có giá trị |
| Không có vạch màu nào | Không có giá trị |

Lưu ý: Nếu vạch control C không chuyển màu chứng tỏ test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch màu tại vùng C). Thông thường do lượng mẫu xét nghiệm không đủ hoặc thực hiện sai kỹ thuật
- Tách huyết thanh hoặc huyết tương càng nhanh càng tốt để tránh hiện tượng tan huyết.
- Chỉ được dùng các mẫu phẩm sạch, không bị hiện tượng tan huyết.
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu huyết thanh và huyết tương có thể bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn -20°C.

55. Hantavirus PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt bộ gen của virus *Hanta* có trong bệnh phẩm

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học)

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học tối thiểu cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Máy điện di
- Máy đọc ảnh gel
- Lò vi sóng
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Giấy xét nghiệm | Tờ |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 2 | Ống đựng bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 4 | Ống nhựa Ependoff 1.7 ml | Ống |
| 5 | Bút viết kính, bút bi, diêm | Cái |
| 6 | Xà phòng | Bánh |
| 7 | Khăn lau tay | Cái |
| 8 | Bông, cùn | Túi |
| 9 | Nước muối sinh lý | ml |
| 10 | Bộ KIT chiết tách DNA | Test |
| 11 | Khẩu hao sinh phẩm cho chứng và kiểm tra chất lượng, standard các loại | Test |
| 12 | PBS Buffer | ml |
| 13 | Absolute Ethanol | ml |
| 14 | UltraPure DNase/RNase Distilled Water | ml |
| 15 | Ultrapure Agarose | Gram |
| 16 | Ultrapure TBE Buffer 10X | ml |
| 17 | 100bp DNA ladder | μ l |
| 18 | 10X BlueJuice Gel Loading dye | μ l |
| 19 | Ultrapure 10mg/ml Ethidium Bromide | μ l |
| 20 | Ống PCR 0,2 ml, nắp phẳng | Cái |
| 21 | Đầu côn 1000 μ l có lọc | Cái |
| 22 | Đầu côn 200 μ l có lọc | Cái |
| 23 | Đầu côn 30 μ l có lọc | Cái |
| 24 | Đầu côn 0,2-10 μ l có lọc | Cái |
| 25 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 26 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Quyển |
| 27 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 28 | Hộp lưu bệnh phẩm | Cái |
| 29 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 30 | Mũ | Cái |
| 31 | Khẩu trang | Cái |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|------------------------------------|--------|
| 32 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 33 | Giấy thấm | Cuộn |
| 34 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA từ bệnh phẩm

2.2. Pha hỗn hợp phản ứng PCR

2.3. Chạy phản ứng PCR

2.4. Điện di sản phẩm PCR

2.5. Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Phản ứng dương tính khi có sản phẩm PCR là một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét, không bị đứt gãy và có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.
- Phản ứng âm tính nếu không có vạch sản phẩm PCR có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường
- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế
- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật.

56. Measles virus Ab miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng virus sởi.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng virus sởi bằng kỹ thuật kỹ thuật ELFA (xét nghiệm huỳnh quang liên kết enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Hệ thống máy VIDAS (VD hoặc các hệ thống tương đương khác)
- Pipet tự động hay bán tự động điều chỉnh được dùng phân phối các thể tích từ 2 µl đến 200 µl .
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| ST T | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|----------------------------------------------------------------------|------|
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, chạy chuẩn và kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 21 | Găng tay | Đôi |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất ví dụ sử dụng sinh phẩm bộ sinh phẩm VIDAS Measles IgG

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm VIDAS Measles IgG (VD)

3. Quy trình chạy mẫu VIDAS Measles IgG (VD)

| Các bước | Nội dung |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1 | Lấy số thanh hóa chất cần dùng từ tủ lạnh và để ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút |
| 3.2 | Sử dụng thanh hóa chất “MSG” và một đầu côn “MSG” SPR cho mỗi mẫu, căn chuẩn và kiểm chứng phải được xét nghiệm. Đảm bảo rằng túi phải được dán lại đúng cách sau khi lấy đủ số đầu côn SPR ra |
| 3.3 | Đánh hoặc chọn “MSG” để nhập mã xét nghiệm. Chất chuẩn được xác định là S1 và được chạy song song hai mẫu. Nếu làm kiểm chứng dương thì xác định là C1. Nếu làm kiểm chứng âm thì xác định là C2. |
| 3.4 | Trộn chất chuẩn, chất kiểm chứng và mẫu sử dụng máy trộn Vortex |
| 3.4.1 | Nhãn trên thanh hóa chất xét nghiệm MSG phù hợp với xác định mẫu. |
| 3.4.2 | Hút 100µl chất chuẩn, mẫu bệnh phẩm hoặc chất kiểm chứng vào trong giếng mẫu. |
| 3.4.3 | Đưa SPR và thanh hóa chất vào trong máy. Kiểm tra các nhãn màu với mã xét nghiệm trên SPR và thanh hóa chất xem đã trùng chưa |
| 3.4.4 | Bắt đầu tiến hành xét nghiệm theo hướng dẫn sử dụng máy. Tất cả các bước xét nghiệm được thực hiện tự động trên máy. Xét nghiệm sẽ hoàn tất trong 35 - 40 phút |
| 3.4.5 | Sau khi xét nghiệm hoàn thành, loại bỏ SPR và thanh hóa chất từ thiết bị |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính giá trị ngưỡng:

- Các giá trị xét nghiệm của Người bệnh và chứng mẫu được so sánh với giá trị ngưỡng được lưu trữ trong máy tính biểu hiện nồng độ nhỏ nhất của kháng thể kháng virus sởi.

- Giá trị xét nghiệm được máy tính toán cho mỗi mẫu bằng tỷ lệ RFV (Giá trị huỳnh quang tương đối) của mẫu và RFV của chất chuẩn.

2. Diễn giải kết quả

Kết quả được diễn giải như bảng dưới đây:

| Kết quả ban đầu (S/CO) | Diễn giải trên thiết bị | Quy trình xét nghiệm lại |
|------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| < 0.5 | KHÔNG PHẢN ỨNG | Không cần thực hiện lại xét nghiệm |
| ≥ 0.7 | PHẢN ỨNG | Xét nghiệm lại lần hai (nếu cần) |
| ≥ 0.5 và <0.7 | KHÔNG XÁC ĐỊNH | Phải làm lại lần 2 trên mẫu mới |

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả hoặc phản ứng không xảy ra thông thường do:

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

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.
- Để tránh nhiễm chéo, cần mang găng tay sạch, không bột khi thao tác
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt khi thực hiện xét nghiệm.
- Không nên dùng mẫu đã thấy rõ bị nhiễm khuẩn bằng mắt thường.
- Không sử dụng các SPR nếu túi bị thủng
- Không sử dụng các SPR (lá kim loại hoặc nhựa bị phá hủy)
- Không sử dụng hóa chất đã hết hạn sử dụng ghi trên nhãn
- Không trộn hóa chất (hoặc hút) từ các lô khác
- Các hóa chất của kit chứa Natri azide, chất này có thể phản ứng với các ống nước bằng đồng hoặc chì tạo thành dạng kim loại azide gây nổ. Nếu bất kỳ chất lỏng nào chứa natri azide được thải vào hệ thống đường ống, các ống này phải được dội nước nhằm tránh sự tích tụ.

57. Rota virus Ag miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định kháng nguyên của virus Rota trong phân người.

2. Nguyên lý

Xác định kháng nguyên của virus Rota dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Pipet đơn kênh thể tích từ 10 µl đến 1000 µl.
- Đầu côn thể tích 10 µl đến 1000 µl.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |

| | | |
|----|------------------------------------|------|
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 21 | Găng tay | Đôi |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Phân.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

VD: Bộ kit EDI™ Fecal Rota virus Antigens ELISA Kit (Epitope Diagnostic) (VD)

| Các bước | Nội dung |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm |
| 2 | Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự. |
| 3 | Chuẩn bị dung dịch rửa và dung dịch pha loãng bệnh phẩm. |
| 4 | Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm. |
| 5 | Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá. |
| 6 | Chuẩn bị chất cộng hợp |
| 7 | Nhỏ 100 µl mẫu chứng âm (2 giếng), mẫu chứng dương (2 giếng) và mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng tương ứng . |
| 8 | Nhỏ 50 µl cộng hợp vào mỗi giếng |
| 9 | Đậy nắp và ủ. |
| 10 | Rửa phiến nhựa. |
| 11 | Nhỏ 100 µl dung dịch hiện màu vào mỗi giếng |
| 12 | Đậy nắp để tránh ánh sáng |
| 13 | Ủ phiến nhựa ở nhiệt độ phòng trong 10 - 20 phút |
| 14 | Nhỏ 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng |
| 15 | Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620 nm trong vòng 10 phút sau khi dừng phản ứng. |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng:

- OD chứng dương > 0,8
- OD chứng âm > 0,15

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

2. Tính giá trị ngưỡng:

Tính giá trị cut-off theo công thức sau:

- CO dương = 1,1 x (Trung bình chứng âm + 0,08)
- CO âm = 0,9 x (Trung bình chứng âm + 0,06)

3. Diễn giải kết quả: Xét OD của mẫu bệnh phẩm:

- Dương tính: nếu OD mẫu > CO dương
- Nghi ngờ: nếu CO âm < OD mẫu < CO dương
- Âm tính: nếu OD mẫu < CO âm

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chủng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

58. Rotavirus PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt bộ gen của *Rotavirus* có trong phân của người .

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học tối thiểu cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Máy điện di
- Máy đọc ảnh gel
- Lò vi sóng
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Giấy xét nghiệm | Tờ |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------------|----------------------------------------------------------|---------------|
| 2 | Dụng cụ lấy bệnh phẩm | Que |
| 3 | Lọ nhựa đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Găng không có bột (DNase-RNase free) | Đôi |
| 5 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 6 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Sinh phẩm chẩn đoán | |
| 8 | Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng | Test |
| 9 | Hóa chất và VTTT cho tách chiết trên máy MPLC | Test |
| 10 | Ống nhựa Eppendorf 1.7 ml | ống |
| 11 | PBS Buffer | mL |
| 12 | Absolute Ethanol | mL |
| 13 | UltraPure DNase/RNase Distilled Water | mL |
| 14 | Ultrapure Agarose | Gram |
| 15 | Ultrapure TBE Buffer 10X | mL |
| 16 | 100bp DNA ladder (Đóng gói 50 ug) | μl |
| 17 | 10X BlueJuice Gel Loading dye Đóng gói 3x1ml | μl |
| 18 | Utrapure 10mg/ml Ethidium Bromide | μl |
| 19 | ống PCR 0,2 ml, nắp phẳng | Cái |
| 20 | Đầu cân 1000 μl có lọc | Cái |
| 21 | Đầu cân 200 μl có lọc | Cái |
| 22 | Đầu cân 0,2-10 μl có lọc | Cái |
| 23 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 24 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 25 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 26 | Bút viết kính | Cái |
| 27 | Bút bi | Cái |
| 28 | Mũ | Cái |
| 29 | Khẩu trang | Cái |
| 30 | Găng tay | Đôi |

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 31 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 32 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 33 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 34 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 35 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 36 | Khăn lau tay | Cái |
| 37 | EQAS (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Phân.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA từ bệnh phẩm

2.2. Pha hỗn hợp phản ứng PCR

2.3. Chạy phản ứng PCR

2.4. Điện di sản phẩm PCR

2.5. Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Phản ứng dương tính khi có sản phẩm PCR là một băng đặc hiệu duy nhất, rõ nét, không bị đứt gãy và có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

- Phản ứng âm tính nếu không có vạch sản phẩm PCR có kích thước tương ứng với đoạn gen đích cần khuếch đại.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng dương tính giả: do tạp nhiễm từ môi trường

- Phản ứng âm tính giả: do phản ứng PCR bị ức chế
- Để hạn chế các hiện tượng trên phải tuân thủ chặt chẽ quy trình kỹ thuật.

59. Rubella virus test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện định tính nhanh kháng thể IgM/IgG kháng Rubella virus trong huyết thanh hoặc huyết tương

2. Nguyên lý

Xét nghiệm nhanh kháng thể IgM/IgG kháng Rubella virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

2. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Máy ly tâm, đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyên bệnh phẩm | Test |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Giấy thấm | Cuộn |

| | | |
|----|----------------------------|-----|
| 12 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 13 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 14 | Bút viết kính | Cái |
| 15 | Bút bi | Cái |
| 16 | Mũ | Cái |
| 17 | Khẩu trang | Cái |
| 18 | Găng tay | Đôi |
| 19 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 20 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 21 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 22 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 23 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 24 | Khăn lau tay | Cái |

3. Bệnh phẩm:

Huyết tương hoặc huyết thanh

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật:

- Để mẫu, túi đựng test và dung dịch xét nghiệm về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm (15 – 20 phút).
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên Người bệnh trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Dùng mỗi pipet mao quản 5 μ l, hút 5 μ l mẫu huyết thanh hoặc huyết tương và nhỏ vào giếng mẫu hình vuông “S”.
- Nhỏ 3-4 giọt (khoảng 90-120 μ l) dung môi thử nghiệm vào giếng dung môi hình tròn.
- Đọc kết quả trong khoảng 20 - 30 phút. Không được đọc kết quả sau 30 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Trên thanh thử phải luôn xuất vạch màu ở vùng C (vạch chứng) thì test thử mới có giá trị chẩn đoán.

Ghi kết quả như bảng sau:

| Hiện tượng | Kết quả |
|-------------------------------------------------|-------------------------------|
| Xuất hiện 2 vạch màu ở vùng C và vùng M | IgM Dương tính |
| Xuất hiện 2 vạch màu ở vùng C và vùng G | IgG Dương tính |
| Xuất hiện 3 vạch màu ở vùng C, vùng M và vùng G | IgM Dương tính/IgG Dương tính |
| Xuất hiện 1 vạch màu ở vùng C | Âm tính |
| Không có vạch màu nào | Không có giá trị |

Lưu ý: Nếu vạch control C không chuyển màu chứng tỏ test xét nghiệm này không có giá trị và cần phải thực hiện lại xét nghiệm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch màu tại vùng C). Thông thường do lượng mẫu xét nghiệm không đủ hoặc thực hiện sai kỹ thuật
- Tách huyết thanh hoặc huyết tương càng nhanh càng tốt để tránh hiện tượng tan huyết (hemolysis).
- Chỉ được dùng các mẫu phẩm sạch, không bị hiện tượng tan huyết (nonhemolyzed).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài. Mẫu huyết thanh và huyết tương có thể bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong vòng 3 ngày. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu phẩm phải được giữ ở nhiệt độ thấp hơn -20°C.

60. Rubella virus Avidity

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định ái tính cao và thấp của kháng thể IgG kháng virus Rubella trong huyết thanh người.

2. Nguyên lý

Xác định ái tính cao và thấp của kháng thể IgG kháng virus Rubella dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Pipet đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l.
- Đầu côn các thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l.

4.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 21 | Găng tay | Đôi |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | EQAS (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

3. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

4. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Rubella IgG Avidity (Delta Biological) (VD)

| Các bước | Nội dung |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm |
| 2 | Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự. |
| 3 | Chuẩn bị dung dịch rửa. |
| 4 | Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm. |
| 5 | Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá. |
| 6 | Xử lý trước mẫu với chất hấp thụ yếu tố dạng thấp (RF) trước khi phát hiện IgM. |
| 7 | Cho chứng (1 giếng trống, 2 giếng chứng dương) và 2 giếng bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình. |
| 8 | Đậy nắp và ủ 60 phút ở 37°C. |
| 9 | Rửa phiến nhựa. |
| 10 | Nhỏ dung dịch rửa vào 1 giếng bệnh phẩm và 1 giếng chứng. Các giếng còn lại nhỏ dung dịch đệm Avidity Buffer vào các giếng còn lại. Chuẩn bị chất cộng hợp |
| 11 | Đậy nắp và ủ 10 phút ở 37°C |
| 12 | Rửa phiến nhựa |
| 13 | Nhỏ dung dịch cộng hợp vào mỗi giếng |
| 14 | Đậy nắp và ủ 45 phút ở 37°C. |
| 15 | Rửa phiến nhựa. |
| 16 | Nhỏ dung dịch hiện màu. |
| 17 | Ủ ở nhiệt độ phòng, không đậy nắp và tránh ánh sáng |
| 18 | Nhỏ dung dịch dừng phản ứng. Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620 nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng. |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng:

- OD giếng chứng ủ với dung dịch rửa phải > 0.500 .
- Phần trăm ái tính của giếng chứng ủ với dung dịch đệm phải cao hơn 45 % so với giếng chứng ủ với dung dịch rửa.

2. Tính toán và diễn giải kết quả:

Phần trăm ái tính của mẫu bệnh phẩm được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ Avidity} = \frac{\text{OD giếng chứng ủ với dung dịch đậm} - \text{OD giếng trống}}{\text{OD giếng chứng ủ với dung dịch rửa} - \text{OD giếng trống}} \times 100$$

- Nếu tỷ số % Avidity > 45 %: có sự xuất hiện kháng thể IgG ái tính cao.
- Nếu tỷ số % Avidity < 35 %: có sự xuất hiện kháng thể IgG ái tính thấp.
- Nếu tỷ số 35 % ≤ % Avidity ≤ 45 %: có sự xuất hiện kháng thể IgG ái tính trung bình (vùng ranh giới cần chú ý)

Chỉ cần tính tỷ số này ở những giếng bệnh phẩm ủ với dung dịch rửa có OD > 0,440. Nếu OD < 0,4 thì cần xét nghiệm lặp lại với mẫu bệnh phẩm pha loãng 1:101.

Những mẫu có tỷ số ái tính ở mức trung bình cần lặp lại xét nghiệm. Những mẫu này cũng nên được kiểm tra lại sau 2 – 3 tuần để đánh giá lại sự biến đổi của tỷ số % ái tính.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bản.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

61. Rubellavirus Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. **Mục đích:** Xác định RNA đặc trưng của *Rubellavirus*

2. **Nguyên lý:** Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học tối thiểu cấp 2
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho ống bệnh phẩm 5ml
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Máy chạy Real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Bộ lưu điện

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |

| | | |
|----|---------------------------------------------------------------------------|------|
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Găng không có bột tan (DNase-RNase free) | Đôi |
| 4 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 6 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 7 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 8 | Kít chiết tách ARN tổng số | Test |
| 9 | Kít tổng hợp cDNA (Nếu bộ kít chạy Real-time PCR không bao gồm RT-PCR) | Test |
| 10 | Ống Falcon 50ml | Cái |
| 11 | Ependoff 1,7ml | Tube |
| 12 | Ependoff 0,2ml | Tube |
| 13 | Đầu côn 10 µl có lọc | Cái |
| 14 | Đầu côn 30 µl | Cái |
| 15 | Đầu côn 200 µl có lọc | Cái |
| 21 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 22 | Water-DEPC Treated | ml |
| 23 | Giấy thấm | Cuộn |
| 24 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 25 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 26 | Bút viết kính | Cái |
| 27 | Bút bi | Cái |
| 28 | Mũ | Cái |
| 29 | Khẩu trang | Cái |
| 30 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 31 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 32 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 33 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 34 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 35 | Khăn lau tay | Cái |
| 36 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Máu, dịch ối, gai nhau, nước tiểu, các loại dịch tiết đường hô hấp (đờm, dịch ty hầu, dịch phế quản, mũi, ngoáy hầu họng...)

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu (nếu cần):

2.2. Tách chiết RNA

2.3. Chạy phản ứng RT-PCR dùng môi ngẫu nhiên (Bỏ qua bước này nếu kit sử dụng real-time PCR có chứa luôn phản ứng RT-PCR)

- Bật máy PCR 15 phút trước khi chạy phản ứng RT-PCR
- Thực hiện bước này với các tube RT-PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube RT-PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng RT-PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho dịch RNA tách chiết vào từng tube RT-PCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy PCR.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy PCR hoạt động theo hướng dẫn của bộ kit RT-PCR.
 - Cho máy PCR chạy chương trình.

2.4 Chạy phản ứng Real-time PCR

- Bật máy real-time PCR 15 phút trước khi cho máy chạy. Bật máy tính và khởi động chương trình real-time PCR.
- Thực hiện bước mix với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube Real-time PCR Mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng Real-time PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng -, các nồng độ standard, dịch cDNA vừa thu nhận được (hoặc RNA vừa tách được nếu kit Real-time PCR có chứa phản ứng RT-

PCR) vào từng tube Real-time PCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.

- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu cho mẫu, chứng dương, chứng âm, standart theo hướng dẫn của bộ kit sử dụng
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Nhận định kết quả qua phân tích của máy dựa trên cơ sở hướng dẫn của bộ kit Real-time PCR được sử dụng.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- 1. Sự cố:** Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.
- 2. Nguyên nhân:** Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.
- 3. Khắc phục:** Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

62. Zika virus Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định RNA đặc trưng của *Zika virus*

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time RT - PCR một bước.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm lạnh ≥ 12000 gpm/phút
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes và các thể tích từ $0,5 \mu\text{l} - 1000 \mu\text{l}$.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Tube hoặc lọ đựng bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 7 | Găng không có bột tal (DNase-RNase free) | Cái |
| 8 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 10 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 11 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 12 | Kit tách RNA | Test |
| 13 | Ống Falcon 50ml | Cái |
| 14 | Ependoff 1,7ml | Tube |
| 15 | Ependoff 0,2ml | Tube |
| 21 | Đầu cân 10 µl có lọc | Cái |
| 22 | Đầu cân 30 µl | Cái |
| 23 | Đầu cân 200 µl có lọc | Cái |
| 24 | Đầu cân 1 ml có lọc | Cái |
| 25 | Water-DEPC Treated | ml |
| 26 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 27 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 28 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 29 | Bút viết kính | Cái |
| 30 | Bút bi | Cái |
| 31 | Mũ | Cái |
| 32 | Khẩu trang | Cái |
| 33 | Găng tay | Đôi |
| 34 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 35 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 36 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 37 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 38 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 39 | Khăn lau tay | Cái |
| 40 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Máu toàn phần, huyết thanh, huyết tương, nước tiểu, mẫu mô và các dịch sinh học khác. Tốt nhất là huyết thanh và nước tiểu.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm VIASURE *Zika, Dengue and Chikungunia* Real-time PCR Detection Kit (VD hoặc tương đương)

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết RNA nếu cần.

2.2. Tách chiết RNA: Tách chiết bằng tay hoặc tự động.

2.3. Hồi chỉnh chứng dương

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Bóc lớp vỏ nhôm che phủ trên đĩa hoặc tube phản ứng.
- Cho dung dịch hồi chỉnh vào mỗi giếng.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch RNA tách chiết vào từng giếng, đầy nắp, ly tâm nhẹ. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Bật máy real-time PCR. Bật máy tính khởi động chương trình real-time PCR trước khi chạy mẫu ít nhất 15 phút.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu Cy5 (*Zika*), FAM (*Dengue*), ROX (*Chikungunya*) cho mẫu, chứng dương và chứng âm và HEX (hoặc JOE/VIC) cho chứng nội.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính

- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu Cy5, FAM, ROX tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (đường biểu diễn dương tính) và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính hoặc thẳng và không vượt qua tín hiệu nền (đường biểu diễn âm tính).
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu Cy5, FAM, ROX âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính.

2. Phân tích mẫu

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng tương ứng với màu của từng tác nhân và bắt đầu từ chu kỳ 40 trở về trước. Mẫu dương tính với Zika virus khi đường biểu diễn tương ứng với màu Cy5 dương tính. Một mẫu có thể dương tính với 1 trong 3 tác nhân hoặc dương tính đồng thời cả 3 tác nhân.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu từ sau chu kỳ 40 → đề nghị lấy mẫu lại để thực hiện xét nghiệm hoặc thực hiện lại xét nghiệm sau 1-3 tháng.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- 1. Sự cố:** Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.
- 2. Nguyên nhân:** Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.
- 3. Khắc phục:** Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

63. Parvovirus B19 IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định định tính kháng thể IgM kháng Parvovirus B19 trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

2. Nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgM kháng Parvovirus B19 dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh .
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Pipet đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l .

2.2 .Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 21 | Găng tay | Đôi |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm SERION ELISA *classic* Parvovirus B19 IgM (Serion) (VD hoặc tương đương)

| Các bước | Nội dung |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm |
| 2 | Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự. |
| 3 | Chuẩn bị dung dịch rửa. |
| 4 | Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm. |
| 5 | Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá. |
| 6 | Xử lý trước mẫu với chất hấp thụ yếu tố dạng thấp (RF) trước khi phát hiện IgM. |
| 7 | Cho chứng (1 giếng trống, 1 chứng âm, 2 giếng chuẩn) và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình. |
| 8 | Đậy tấm và ủ. |
| 9 | Rửa phiến nhựa. |
| 10 | Chuẩn bị chất cộng hợp |
| 11 | Đậy tấm và ủ |
| 12 | Rửa phiến nhựa |
| 13 | Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng |
| 14 | Ủ phiến nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng |
| 15 | Nhỏ dung dịch dừng phản ứng |
| 16 | Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 405 và 650nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng. |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng:

- OD giếng trống phải < 0.25
- Chứng âm phải cho kết quả âm tính.
- Giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình của huyết thanh chuẩn ngưỡng phải trong khoảng hợp lệ ghi trong Giấy kiểm tra chất lượng bộ kit (Sau khi trừ đi độ hấp thụ của giếng trắng).
- Sự dao động giá trị OD của huyết thanh chuẩn không được cao hơn 20%.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

2. Diễn giải kết quả:

Sử dụng phần mềm tính toán tự động tín hiệu quang học đo được. Có thể sử dụng các phần mềm sau: SERION easyANALYZE, SERION evaluate, SERION activity dựa trên Microsoft® Excel®.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

64. Parvovirus B19 IgG miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định định tính kháng thể IgG kháng Parvovirus B19 trong huyết thanh hoặc huyết tương người.

2. Nguyên lý

Xác định định tính kháng thể IgG kháng Parvovirus B19 dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Micropipettes đơn kênh thể tích từ 10µl đến 1000µl .

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chủng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 21 | Găng tay | Đôi |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm SERION ELISA *classic* Parvovirus B19 IgG (Serion) (VD hoặc tương đương)

| Các bước | Nội dung |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm |
| 2 | Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự. |
| 3 | Chuẩn bị dung dịch rửa. |
| 4 | Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm. |
| 5 | Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá. |
| 6 | Cho chứng (1 giếng trống, 1 chứng âm, 2 giếng chuẩn) và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình. |
| 7 | Đậy tấm và ủ. |
| 8 | Rửa phiến nhựa. |
| 9 | Chuẩn bị chất cộng hợp |
| 10 | Đậy tấm và ủ |
| 11 | Rửa phiến nhựa |
| 12 | Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng |
| 13 | Ủ phiến nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng |
| 14 | Nhỏ dung dịch dừng phản ứng |
| 15 | Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 405 và 650nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng. |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng:

- OD giếng trống phải < 0.25
- Chứng âm phải cho kết quả âm tính.
- Giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình của huyết thanh chuẩn ngưỡng phải trong khoảng hợp lệ ghi trong Giấy kiểm tra chất lượng bộ kit (Sau khi trừ đi độ hấp thụ của giếng trắng).
- Sự dao động giá trị OD của huyết thanh chuẩn không được cao hơn 20%.

Nếu một trong các điều kiện trên không đạt, phải chạy lại xét nghiệm

2. Diễn giải kết quả:

Sử dụng phần mềm tính toán tự động tín hiệu quang học đo được. Có thể sử dụng các phần mềm sau: SERION easyANALYZE, SERION evaluate, SERION activity dựa trên Microsoft® Excel®.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

65. Parvo virus B19 Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện và định lượng Parvo virus B19 trong huyết tương hoặc huyết thanh và dịch ối của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Máy tách chiết acid nucleic.
- Bộ lưu điện.
- Máy ủ nhiệt.
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm lạnh ≥ 12000 gpm/phút
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ $0,5\ \mu\text{l} - 1000\ \mu\text{l}$.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Tube đựng bệnh phẩm 5 ml | Cái |
| 4 | Cryotube (lưu mẫu dương tính) | Cái |
| 5 | LightMix® Kit Parvovirus B19 | Test |

| | | |
|----|--------------------------------------------|-------|
| 6 | LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe | Test |
| 7 | LightCycler 8-Tube Strips | Cái |
| 8 | Hóa chất và VTTT cho tách chiết trên MPLC | Test |
| 9 | LightMix Color Compensation 530 / 690 | Test |
| 10 | Hóa chất chạy đường chuẩn | Test |
| 11 | Pipet nhựa | Cái |
| 12 | Đầu Pipét có lọc 1000 ul | Cái |
| 13 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 14 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 15 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Quyển |
| 21 | Bút viết kính | Cái |
| 22 | Bút bi | Cái |
| 23 | Mũ giấy | Cái |
| 24 | Khẩu trang | Cái |
| 25 | Găng không có bột tal | Đôi |
| 26 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 27 | Quần áo | Bộ |
| 28 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 29 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 30 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 31 | Khăn lau tay | Cái |
| 32 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh, huyết tương, và dịch ối.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

LightMix® Kit Parvovirus B19 EC (Roche – VD hoặc tương đương)

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết RNA nếu cần.

2.2. Tách chiết DNA:

Tách chiết bằng tay hoặc máy tự động

2.3. Chạy bù màu và thẩm định file bù màu:

Theo hướng dẫn kit LightMix® Color Compensation HybProbe. Bù màu khuyến cáo chạy khi thay lô của kit hoặc 6 tháng chạy bù màu 1 lần.

2.4. Thực hiện phản ứng real-time PCR

* Bật máy LC480, bật máy tính và phần mềm LC480.

- Pha hóa chất:

2.4.1 Pha hỗn hợp primer và probe cho B19 (PSR) và Chứng nội ECT (reaction control)

2.4.2 Chuẩn bị ECT

2.4.3 Chuẩn bị mẫu

2.4.4 Chuẩn bị NTC (chứng âm)

2.4.5 Chuẩn bị dây ống mẫu chuẩn

2.4.6 Chuẩn bị trộn hỗn hợp phản ứng PCR

2.4.7 Chạy real-time PCR

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

+ Giá trị định lượng chấp nhận được nếu cả 3 chứng: chứng âm, chứng dương và chứng nội có nghĩa. Các chứng có giá như sau:

+ Chứng âm: không phát hiện.

+ Chứng dương: nằm trong khoảng cho phép của nhà sản xuất (đặc hiệu với từng lô thuốc thử).

+ Chứng nội: với chứng âm và mẫu có nồng độ thấp (10-1000 copies) phải có tín hiệu lên ứng với Ct khoảng 27 đến 30.

+ Ngược lại:

- Chứng âm: Nếu chứng âm không hợp lệ thì phải thực hiện lại xét nghiệm cả chứng và toàn bộ lô bệnh phẩm.

- Chứng dương: Nếu chứng dương không hợp lệ thì phải làm lại xét nghiệm toàn bộ mẻ chạy.

+ Chứng nội: không có tín hiệu lên với chứng âm và mẫu có nồng độ thấp (10-1000copies) ứng với Ct khoảng 27 đến 30 thì phải chạy lại mẫu đó.

2. Phân tích mẫu

2.1. Bảng biện luận kết quả:

| Mẫu Parvo B19 Kênh 640 | Chứng nội Kênh 670 | Chứng dương Kênh 640 | Chứng âm NTC Kênh 640 | Biện luận kết quả |
|------------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| Không khuếch đại | Có khuếch đại | Khuếch đại | Âm tính | Âm tính (không phát hiện) |
| Ct < 37 | NA | Khuếch đại | Âm tính | Dương tính cho B19 |
| Không khuếch đại | Không khuếch đại | Khuếch đại | NA | PCR Failed, chạy lại |
| NA | NA | Không khuếch đại | NA | PCR Failed, chạy lại |
| NA | NA | NA | Dương tính | Nhiễm, Chạy lại |

2.2 Hệ số chuyển đổi

Định lượng virus (VL) được tính toán sử dụng công thức sau:

$$VL(\text{copies/ml}) = MV(\text{giá trị đo được}) \times EVF \times SF$$

Trong đó:

VL = giá trị định lượng

MV = giá trị đo được [số copy trên phản ứng]

EVF = hệ số thể tích tách chiết [thể tích tách chiết thu được/ thể tích PCR]

SF = hệ số mẫu [1000 µl/thể tích tách chiết của mẫu bệnh phẩm]

Ví dụ:

Lấy 200 µl mẫu bệnh phẩm đi tách chiết thì hệ số mẫu SF = 1000/200=5.

Dùng 5 µl trong tổng thể tích thu hồi là 100 µl làm template mix PCR thì hệ số thể tích tách chiết = 100/5=20.

Kết quả hệ số chuyển đổi là:

$$VL (\text{copies/ml}) = MV (\text{giá trị đo được copies/phản ứng } 20 \mu\text{l}) \times 5 \times 20$$

$$VL (\text{copies/ml}) = MV(\text{copies/phản ứng}) \times 100$$

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sự cố: Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

2. Nguyên nhân: Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

3. Khắc phục: Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

66. Chikungunia IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng Chikungunya trong huyết thanh hoặc huyết tương người

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng Chikungunya bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym)

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Hệ thống máy ELISA
- Pipet tự động hay bán tự động điều chỉnh được dùng phân phối các thể tích từ 2 μ l đến 200 μ l .
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| ST T | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 20 | Găng tay | Đôi |
| 21 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 22 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 23 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 24 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 25 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 26 | Khăn lau tay | Cái |
| 27 | EQAS (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất ví dụ sử dụng sinh phẩm **Chikungunya IgM ELISA Kit**

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Chikungunya IgM ELISA Kit (VD hoặc tương đương)

3. Qui trình chạy mẫu Chikungunya IgM ELISA Kit:

| Các bước | Nội dung |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1 | - Chuẩn bị đủ số giếng cần sử dụng. |
| 3.2 | - Pha dung dịch rửa: Pha dung dịch rửa bằng nước cất với tỷ lệ 1 dung dịch rửa + 19 nước cất. |
| 3.3 | - Lọ kháng nguyên Chikungunya đông khô được hoàn nguyên bằng 1ml dung dịch nước rửa. |
| 3.4 | - Cho 50 µl chứng thấp, chứng chuẩn, chứng cao hoặc bệnh phẩm vào các giếng tương ứng.(Giếng A1 là giếng trống). Đậy nắp. |
| 3.5 | - Ủ ở 37°C ± 1°C trong 60 ± 5 phút |
| 3.6 | - Cho 50µl dung dịch kháng nguyên đã hoàn nguyên vào các giếng (trừ giếng trống). Đậy nắp. |
| 3.7 | - Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng |
| 3.8 | - Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Thấm khô. |
| 3.9 | - Cho 50 µl dung dịch kháng thể vào các giếng (trừ giếng trống). Đậy nắp. |
| 3.10 | - Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng |
| 3.11 | - Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Thấm khô. |
| 3.12 | - Cho 50 µl dung dịch cộng hợp Streptavidin peroxidase vào các giếng (trừ giếng trống). Đậy nắp. |
| 3.13 | - Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng |
| 3.14 | - Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa. Ngâm >5 giây giữa mỗi lần rửa. Thấm khô. |
| 3.15 | - Cho vào mỗi giếng 100 µl TMB. |
| 3.16 | - Để ở nhiệt độ phòng đúng 15 phút, tránh ánh sáng. |
| 3.17 | - Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng. |
| 3.18 | - Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450/620 nm trong vòng 30 sau khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng |
| 3.19 | - Để ở nhiệt độ phòng đúng 15 phút, tránh ánh sáng. |
| 3.20 | - Cho 100 µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng. |
| 3.21 | - Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 450/620 nm trong vòng 30 sau khi nhỏ dung dịch dừng phản ứng |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính giá trị ngưỡng:

Kết quả được đọc trên máy đọc ELISA như sau:

- Thử nghiệm có giá trị khi thỏa mãn điều kiện:
- Giếng trống < 0.1
- Chứng thấp < chứng chuẩn < chứng cao
- Giá trị hấp thụ chứng chuẩn trong khoảng 0.150 - 1.300
- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (CO):

$$OD\ CO = (OD\ CO1 + OD\ CO2)/2$$

CO1: Giá trị chứng chuẩn 1

CO2: Giá trị chứng chuẩn 2

- Tính tỉ số mẫu: Tỉ số mẫu = giá trị OD của mẫu x 10 / giá trị ngưỡng

3. Diễn giải kết quả

+ Nếu tỉ số < 9: mẫu thử thấp.

+ Nếu $9 \leq$ tỉ số ≤ 11 : mẫu thử cần phải xét nghiệm lại. Nên thử sau 2-4 tuần. Nếu kết quả vẫn là $9 \leq$ tỉ số ≤ 11 thì kết luận mẫu thử thấp.

+ Nếu tỉ số > 11: mẫu thử cao.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả hoặc phản ứng không xảy ra thông thường do:

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

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Không nên dùng mẫu đã thấy rõ bị nhiễm khuẩn bằng mắt thường.
- Chỉ sử dụng các pipette và các dụng cụ sạch.
- Nắp vụn của lọ thuốc thử không được lẫn giữa các lọ thuốc thử để tránh nhiễm chéo.
- Đóng lọ thuốc thử ngay lập tức sau khi sử dụng để tránh bay hơi và ô nhiễm vi sinh vật.

67. Cryptosporidium test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định định tính Cryptosporidium có trong mẫu bệnh phẩm phân của người.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng nguyên của Cryptosporidium từ mẫu phân bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

3. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Đồng hồ đo thời gian.
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------|--------|
| 1 | Que lấy bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Lọ đựng bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Giấy thấm | Cuộn |
| 8 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 9 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 10 | Bút viết kính | Cái |
| 11 | Bút bi | Cái |

| | | |
|----|----------------------------|-----|
| 12 | Mũ | Cái |
| 13 | Khẩu trang | Cái |
| 14 | Găng tay | Đôi |
| 15 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 16 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 17 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 18 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 19 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 20 | Khăn lau tay | Cái |

3. Bệnh phẩm

Phân

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Đưa thanh thử để ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Bộ sinh phẩm chẩn đoán của Remel Xpect® Giardia/Cryptosporidium (VD)

1. Mẫu phân tươi nên được pha loãng 1: 4 (0,1 ml mẫu và 0,3 ml nước cất) trước khi thử nghiệm.
2. Dán nhãn ống và thêm 4 giọt dung dịch đệm pha loãng mẫu vào ống.
3. Dùng pipet chuyên 0.1 ml mẫu bệnh phẩm đã pha loãng vào ống, trộn đều.
4. Thêm 4 giọt Conjugate vào ống, trộn đều.
5. Dùng pipet chuyên 0,2 ml của mẫu đã pha loãng vào giếng tròn của thanh thử.
6. Đọc kết quả xét nghiệm sau 15 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- **Âm tính:** chỉ có vạch C.

- **Dương tính:** + Cryptosporidium

Mẫu dương tính với Cryptosporidium nếu xuất hiện một vạch C và một vạch màu đỏ tại CRYP (Một vạch màu hồng được xác định kết quả dương tính).

- Không giá trị: không có vạch C. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Kiểm tra hóa chất, hạn sử dụng trước khi dùng.
- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch màu tại vạch C).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu càng sớm càng tốt. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài.

68. *Echinococcus granulosus* (Sán dây chó)

Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Echinococcus granulosus* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Echinococcus granulosus* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh/Ký sinh trùng.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh/Ký sinh trùng.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy đọc ELISA.
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2°C -8°C
- Micropipette và Đầu cân 10 µl, 200 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Ống nghiệm.
- Ống đong chia vạch.
- Giấy thấm.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 2 | Tube lấy bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Mũ | Cái |
| 4 | Khẩu trang | Cái |
| 5 | Găng tay | Đôi |
| 6 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |

| | | |
|----|-------------------------------------|-------|
| 7 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 8 | Bút viết kính | Cái |
| 9 | Bút bi | Cái |
| 10 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Quyển |
| 11 | Dung dịch rửa tay | ml |
| 12 | Khăn lau tay | Cái |
| 13 | Panh | Cái |
| 14 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 15 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 16 | Đầu cân 10 ml | Cái |
| 17 | Đầu cân 200 ml | Cái |
| 18 | Đầu cân 1000 ml | Cái |
| 19 | Pipet nhựa | Cái |
| 20 | Sinh phẩm chẩn đoán (QC) | Test |
| 21 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 22 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện) * | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. Các bước tiến hành

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm chẩn đoán của Scimedx (USA)

2.1. Lấy bộ kit ra khỏi tủ lạnh, lấy đủ số giếng cần làm.

2.2. Nhỏ chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng 1/64 vào mỗi giếng.

2.3. Ủ ở nhiệt độ 15-25°C trong 10 phút

- 2.4. Rửa với dung dịch rửa đã pha loãng, lắc sạch nước.
- 2.5. Thêm Conjugate vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- 2.6. Rửa với dung dịch rửa đã pha loãng, lắc sạch nước.
- 2.7. Nhỏ TMB vào mỗi giếng ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- 2.8. Nhỏ Stop Solution.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đọc kết quả

Cài đặt bước sóng máy đọc là 450nm/650nm-620nm.

Đọc kết quả theo hướng dẫn của bộ kit.

2. Kiểm tra chất lượng

- Kiểm tra chất lượng cho phép đánh giá sự ổn định của bộ kit. Bộ kit không được sử dụng nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm rơi ra khỏi ngưỡng quy định.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Rửa kỹ các giếng thử. Sau khi rửa vữa nhẹ thanh nhựa vào giấy thấm cho ráo nước và làm tiếp các bước tiếp theo ngay không để các giếng bị khô.

69. *Paragonimus* (Sán lá phổi) Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Paragonimus* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Paragonimus* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh/Ký sinh trùng.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh/Ký sinh trùng.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy đọc ELISA.
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2°C -8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Ống nghiệm.
- Ống đong chia vạch.
- Giấy thấm.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 2 | Tube lấy bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Mũ | Cái |
| 4 | Khẩu trang | Cái |
| 5 | Găng tay | Đôi |
| 6 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 7 | Quần áo bảo hộ | Bộ |

| | | |
|----|-------------------------------------|-------|
| 8 | Bút viết kính | Cái |
| 9 | Bút bi | Cái |
| 10 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Quyển |
| 11 | Dung dịch rửa tay | ml |
| 12 | Khăn lau tay | Cái |
| 13 | Panh | Cái |
| 14 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 15 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 16 | Đầu cân 10 ml | Cái |
| 17 | Đầu cân 200 ml | Cái |
| 18 | Đầu cân 1000 ml | Cái |
| 19 | Pipet nhựa | Cái |
| 20 | Sinh phẩm chẩn đoán (QC) | Test |
| 21 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 22 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện) * | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. Các bước tiến hành

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm chẩn đoán của Scimedx (USA) (VD)

2.1. Lấy bộ kit ra khỏi tủ lạnh, lấy đủ số giếng cần làm.

2.2. Nhỏ chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng 1/64 vào mỗi giếng.

2.3. Ủ ở nhiệt độ 15°C -25°C trong 10 phút

2.4. Rửa với dung dịch rửa đã pha loãng, lắc sạch nước.

- 2.5. Thêm Conjugate vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- 2.6. Rửa với dung dịch rửa đã pha loãng, lắc sạch nước.
- 2.7. Nhỏ TMB vào mỗi giếng ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- 2.8. Nhỏ Stop Solution.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đọc kết quả

Cài đặt bước sóng máy đọc là 450nm/650nm-620nm.

Đọc kết quả theo hướng dẫn của bộ kit.

2. Kiểm tra chất lượng

- Kiểm tra chất lượng cho phép đánh giá sự ổn định của bộ kit. Bộ kit không được sử dụng nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm rơi ra khỏi ngưỡng quy định.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

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

Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

70. *Schistosoma* (Sán máng) Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Schistosoma* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Schistosoma* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh/Ký sinh trùng.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh/Ký sinh trùng.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy đọc ELISA.
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2°C -8°C.
- Micropipette và Đầu cân 10 µl, 200 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu.
- Ống nghiệm.
- Ống đong chia vạch.
- Giấy thấm.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 2 | Tube lấy bệnh phẩm | Cái |
| 3 | Mũ | Cái |
| 4 | Khẩu trang | Cái |
| 5 | Găng tay | Đôi |
| 6 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 7 | Quần áo bảo hộ | Bộ |

| | | |
|----|----------------------------------------------------------|-------|
| 8 | Bút viết kính | Cái |
| 9 | Bút bi | Cái |
| 10 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Quyển |
| 11 | Dung dịch rửa tay | ml |
| 12 | Khăn lau tay | Cái |
| 13 | Panh | Cái |
| 14 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 15 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 16 | Đầu côn 10 µl | Cái |
| 17 | Đầu côn 200 µl | Cái |
| 18 | Đầu côn 1000 µl | Cái |
| 19 | Pipet nhựa | Cái |
| 20 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng | Test |
| 21 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 22 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện) * | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. Các bước tiến hành

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm chẩn đoán của Scimedx (USA) (VD)

2.1. Lấy bộ kit ra khỏi tủ lạnh, lấy đủ số giếng cần làm.

2.2. Nhỏ chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng 1/64 vào mỗi giếng.

2.3. Ủ ở nhiệt độ 15°C -25°C trong 10 phút

- 2.4. Rửa với dung dịch rửa đã pha loãng, lắc sạch nước.
- 2.5. Thêm Conjugate vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- 2.6. Rửa với dung dịch rửa đã pha loãng, lắc sạch nước.
- 2.7. Nhỏ TMB vào mỗi giếng ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- 2.8. Nhỏ dung dịch dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đọc kết quả

Cài đặt bước sóng máy đọc là 450nm/650nm-620nm.

Đọc kết quả theo hướng dẫn của bộ kit.

2. Kiểm tra chất lượng

Kiểm tra chất lượng cho phép đánh giá sự ổn định của bộ kit. Bộ kit không được sử dụng nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm vượt ra khỏi ngưỡng quy định

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

71. *Toxoplasma gondii* IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng *Toxoplasma gondii*

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng *Toxoplasma gondii* bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh/Ký sinh trùng.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh/Ký sinh trùng.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Hệ thống máy ELISA
- Pipet tự động hay bán tự động điều chỉnh được dùng phân phối các thể tích từ 2 µl đến 200 µl, 100 µl-1000 µl.
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| ST T | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|------|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | Kg |
| 2 | Dây garô | Cái |
| 3 | Cồn | ml |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 5 | Panh | Cái |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chúng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Nước cất | ml |
| 12 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 14 | Giấy thấm | Cuộn |
| 15 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 16 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Bút viết kính | Cái |
| 18 | Bút bi | Cái |
| 19 | Mũ | Cái |
| 20 | Khẩu trang | Cái |
| 20 | Găng tay | Đôi |
| 21 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 22 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 23 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 24 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 25 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 26 | Khăn lau tay | Cái |
| 27 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất ví dụ sử dụng sinh phẩm **SERION ELISA Toxoplasma gondii IgM**

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm SERION ELISA Toxoplasma gondii IgM (VD)

3. Quy trình chạy mẫu SERION ELISA Toxoplasma gondii IgM (VD hoặc tương đương):

| Các bước | Nội dung |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1 | - Chuẩn bị đủ số giếng cần sử dụng. |
| 3.2 | - Pha dung dịch rửa: Pha loãng chất rửa đậm cô đặc (V1) 01:30 với nước cất cho ra dung tích cuối cùng của V2. |
| 3.3 | - RF- absorbent được thực hiện bằng cách ủ mẫu của Người bệnh trong chất đậm Rf pha loãng trong 15 phút ở nhiệt độ phòng hoặc qua đêm ở 4 °C : 200 µl Rf-absorbent +800 µl dung dịch đậm pha loãng. |
| 3.3 | - Pha loãng mẫu với 10µl bệnh phẩm+1000µl Rf- đậm pha loãng |
| 3.4 | - Cho 100 µl mẫu chứng và mẫu pha loãng vào các giếng theo thứ tự: A1: Giếng trống B1: Chứng âm C1: Huyết thanh chuẩn D1: Huyết thanh chuẩn Từ E1: Bệnh phẩm đã pha loãng |
| 3.5 | - Ủ ở 37 ° C (+ / - 1 ° C) trong 60 phút (+ / - 5 phút) |
| 3.6 | - Rửa 4 lần bằng dung dịch rửa. Thấm khô |
| 3.7 | - Cho 100 µl dung dịch cộng hợp vào các giếng thích hợp (trừ giếng trống) |
| 3.8 | - Ủ ở 37°C (+/- 1°C) trong máy ủ hơi trong 30 phút (+/- 1 phút) |
| 3.9 | - Rửa 4 lần bằng dung dịch rửa. Thấm khô. |
| 3.10 | - Thêm 100µl dung dịch cơ chất vào mỗi giếng (bao gồm giếng trống) |
| 3.11 | - Ủ ở 37°C (+/- 1°C) trong máy ủ hơi trong 30 phút (+/- 1 phút) |
| 3.12 | - Thêm 100µl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, lắc các giếng một cách nhẹ nhàng để trộn đều dung dịch |
| 3.13 | - Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 405/620 nm. Đọc kết quả OD trong 60 phút |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính giá trị ngưỡng:

- Kết quả được đọc trên máy đọc ELISA và đối với việc đánh giá tự động của tín hiệu đo lường quang học, các phần mềm SERION easyANALYZE, các phần mềm SERION đánh giá cũng như phần mềm Microsoft® Excel® - dựa trên công cụ phần mềm SERION activity có sẵn theo yêu cầu.

Thử nghiệm có giá trị khi thỏa mãn điều kiện:

- Giếng trống không chất nền phải là $<0,25$ OD.
- Chứng âm: phải âm tính.
- Bằng cách sử dụng các xét nghiệm định lượng SERION ELISA classic kiểm tra giá trị OD- trung bình (sau khi trừ giếng trống cơ chất) của huyết thanh chuẩn phải nằm trong phạm vi hiệu chuẩn, được đưa ra trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng theo lô cụ thể.
- Bằng cách sử dụng các xét nghiệm định lượng SERION ELISA classic kiểm tra giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình tại ngưỡng huyết thanh phải nằm trong phạm vi hiệu chuẩn, được đưa ra trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng lô cụ thể (sau khi trừ giếng trống cơ chất).
- Biến thiên các giá trị OD của huyết thanh chuẩn hoặc huyết thanh tại ngưỡng không thể cao hơn 20%.
- Nếu các tiêu chí này không được đáp ứng, xét nghiệm không có giá trị phải được lặp lại.

3. Diễn giải kết quả

- Các khoảng ranh giới của xét nghiệm SERION ELISA *classic* Toxoplasma gondii IgM được quy định trong giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng và cho biết ranh giới của kết quả xét nghiệm:

+ Các giá trị dưới khoảng này: Âm tính; + Các giá trị trên phạm vi này: Dương tính.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả hoặc phản ứng không xảy ra thông thường do:

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

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.

- Không nên dùng mẫu đã thấy rõ bị nhiễm khuẩn bằng mắt thường.

72. Toxoplasma gondii IgG miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng Toxoplasma gondii

2. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

II. CHUẨN BỊ

1. Kỹ thuật viên/Cử nhân

- Người thực hiện: Kỹ thuật viên/Cử nhân, nhân viên đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh/Ký sinh trùng.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Kỹ thuật viên/Cử nhân có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh/Ký sinh trùng.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

Phương tiện, hóa chất như ví dụ dưới đây hoặc tương đương.

2.1. Trang thiết bị

- Hệ thống máy ELISA
- Pipet tự động hay bán tự động điều chỉnh được dùng phân phối các thể tích từ 2 µl đến 200 µl, 100 µl-1000 µl.
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 4⁰C – 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)

2.2 Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| ST T | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị | Số lượng |
|-------------|------------------------------------------|---------------|-----------------|
| 1 | Bông | Kg | 0,001 |
| 2 | Dây garô | Cái | 0,001 |
| 3 | Cồn | ml | 1,000 |
| 4 | Bơm kim tiêm | Cái | 1,000 |
| 5 | Panh | Cái | 0,0001 |
| 6 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái | 0,0001 |
| 7 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái | 0,001 |
| 8 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái | 2,000 |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test | 1,000 |

| | | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|--------|
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test | 3,000 |
| 11 | Chứng ngoại kiểm âm (nếu có) | ml | 0,030 |
| 12 | Chứng ngoại kiểm dương (nếu có) | ml | 0,030 |
| 13 | Nước cất | ml | 8,000 |
| 14 | Đầu cân 1000 µl | Cái | 2,000 |
| 15 | Đầu cân 200 µl | Cái | 6,000 |
| 16 | Giấy thấm | Cuộn | 0,100 |
| 17 | Giấy xét nghiệm | Tờ | 2,000 |
| 18 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ | 0,001 |
| 19 | Bút viết kính | Cái | 0,020 |
| 20 | Bút bi | Cái | 0,010 |
| 20 | Mũ | Cái | 0,020 |
| 21 | Khẩu trang | Cái | 0,020 |
| 22 | Găng tay | Đôi | 0,100 |
| 23 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi | 0,020 |
| 24 | Quần áo bảo hộ | Bộ | 0,005 |
| 25 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml | 8,000 |
| 26 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml | 1,000 |
| 27 | Dung dịch khử trùng | ml | 10,000 |
| 28 | Khăn lau tay | Cái | 0,010 |
| 29 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | | 0,005 |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

Các bước tiến hành thực hiện theo phương tiện, hóa chất ví dụ sử dụng sinh phẩm **SERION ELISA Toxoplasma gondii IgG** (VD hoặc tương đương)

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm SERION ELISA Toxoplasma gondii IgG (VD)

3. Qui trình chạy mẫu SERION ELISA Toxoplasma gondii IgG:

| Các bước | Nội dung |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1 | - Chuẩn bị đủ số giếng cần sử dụng. |
| 3.2 | - Pha dung dịch rửa: Pha loãng chất rửa đậm cô đặc (V1) 01:30 với nước cất cho ra dung tích cuối cùng của V2. |
| 3.3 | - Pha loãng mẫu với 10 μ l bệnh phẩm+1000 μ l dung dịch pha loãng |
| 3.4 | - Cho 100 μ l mẫu chứng và mẫu pha loãng vào các giếng theo thứ tự: A1: Giếng trống B1: Chứng âm C1: Huyết thanh chuẩn D1: Huyết thanh chuẩn Từ E1: Bệnh phẩm đã pha loãng |
| 3.5 | - Ủ ở 37 ° C (+ / - 1 ° C) trong 60 phút (+ / - 5 phút) |
| 3.6 | - Rửa 4 lần bằng dung dịch rửa. Thấm khô |
| 3.7 | - Cho 100 μ l dung dịch cộng hợp vào các giếng thích hợp (trừ giếng trống) |
| 3.8 | - Ủ ở 37°C (+/- 1°C) trong máy ủ hơi trong 30 phút (+/- 1 phút) |
| 3.9 | - Rửa 4 lần bằng dung dịch rửa. Thấm khô. |
| 3.10 | - Thêm 100 μ l dung dịch cơ chất cho vào mỗi giếng (bao gồm giếng trống) |
| 3.11 | - Ủ ở 37°C (+/- 1°C) trong máy ủ hơi trong 30 phút (+/- 1 phút) |
| 3.12 | - Thêm 100 μ l dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, lắc các giếng một cách nhẹ nhàng để trộn đều dung dịch |
| 3.13 | - Đọc kết quả trên máy đọc ELISA ở bước sóng 405/620 nm. Đọc kết quả OD trong 60 phút |

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính giá trị ngưỡng:

- Kết quả được đọc trên máy đọc ELISA và đối với việc đánh giá tự động của tín hiệu đo lường quang học, các phần mềm SERION easyANALYZE, các phần mềm SERION đánh giá cũng như phần mềm Microsoft® Excel® - dựa trên công cụ phần mềm SERION activity có sẵn theo yêu cầu.

Thử nghiệm có giá trị khi thỏa mãn điều kiện:

- Giếng trông không chất nền phải là <0,25 OD.
- Việc chất chứng âm tính phải tạo ra kết quả xét nghiệm âm tính.
- Bằng cách sử dụng các xét nghiệm định lượng SERION ELISA classic kiểm tra giá trị OD- trung bình (sau khi trừ giếng trông cơ chất) của huyết thanh chuẩn phải nằm trong phạm vi hiệu chuẩn, được đưa ra trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng theo lô cụ thể.
- Bằng cách sử dụng các xét nghiệm định lượng SERION ELISA classic kiểm tra giá trị OD của chứng dương và giá trị OD trung bình tại ngưỡng huyết thanh phải nằm trong phạm vi hiệu chuẩn, được đưa ra trên giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng lô cụ thể (sau khi trừ giếng trông cơ chất).
- Biến thiên các giá trị OD của huyết thanh chuẩn hoặc huyết thanh tại ngưỡng không thể cao hơn 20%.
- Nếu các tiêu chí này không được đáp ứng, xét nghiệm không có giá trị phải được lặp lại.

2. Diễn giải kết quả

- Các khoảng ranh giới của xét nghiệm SERION ELISA *classic* Toxoplasma gondii IgG được quy định trong giấy chứng nhận kiểm tra chất lượng và cho biết ranh giới của kết quả xét nghiệm. Các giá trị dưới khoảng này được hiểu là cho 1 kết quả xét nghiệm âm tính; các giá trị trên phạm vi này được hiểu là cho 1 kết quả xét nghiệm dương tính.
- SERION ELISA Toxoplasma IgG có thể được sử dụng như là một xét nghiệm sàng lọc. Kết quả âm tính với SERION ELISA Toxoplasma IgG (<10 LU / ml)

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả hoặc phản ứng không xảy ra thông thường do:

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

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.

- Không nên dùng mẫu đã thấy rõ bị nhiễm khuẩn bằng mắt thường

73. *Trichinella spiralis* (Giun xoắn)

Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Trichinella spiralis* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Trichinella spiralis* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Kỹ thuật viên/Cử nhân, nhân viên đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh/ Ký sinh trùng.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh / Ký sinh trùng, có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh/ Ký sinh trùng

2. Phương tiện, hóa chất

Phương tiện, hóa chất như ví dụ dưới đây hoặc tương đương.

2.1. Trang thiết bị

- Máy đọc ELISA.
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2°C -8°C
- Micropipette và Đầu cân 10 µl, 200 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Ống nghiệm.
- Ống đong chia vạch.
- Giấy thấm.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị | Số lượng |
|-----|-----------------------------------|--------|----------|
| 1 | Giấy xét nghiệm | Tờ | 2,000 |
| 2 | Tube lấy bệnh phẩm | Cái | 1,000 |

| | | | |
|----|-------------------------------------------------|-------|--------|
| 3 | Mũ | Cái | 0,100 |
| 4 | Khẩu trang | Cái | 0,100 |
| 5 | Găng tay | Đôi | 2,000 |
| 6 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi | 0,020 |
| 7 | Quần áo bảo hộ | Bộ | 0,001 |
| 8 | Bút viết kính | Cái | 0,020 |
| 9 | Bút bi | Cái | 0,010 |
| 10 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Quyển | 0,001 |
| 11 | Dung dịch rửa tay | ml | 8,000 |
| 12 | Khăn lau tay | Cái | 0,010 |
| 13 | Panh | Cái | 0,0001 |
| 14 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái | 0,0001 |
| 15 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái | 0,0001 |
| 16 | Đầu cân 10 ml | Cái | 1,000 |
| 17 | Đầu cân 200 ml | Cái | 4,000 |
| 18 | Đầu cân 1000 ml | Cái | 1,000 |
| 19 | Pipet nhựa | Cái | 1,000 |
| 20 | Sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng | Test | 0,400 |
| 21 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test | 1,000 |
| 22 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện) * | | 0,005 |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/200 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 2 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Huyết thanh

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. Các bước tiến hành

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm chẩn đoán của Scimedx (USA)

- 2.1. Lấy bộ kit ra khỏi tủ lạnh, lấy đủ số giếng cần làm.
- 2.2. Nhỏ chứng dương, chứng âm và mẫu huyết thanh đã pha loãng 1/64 vào mỗi giếng.
- 2.3. Ủ ở nhiệt độ 15-25°C trong 10 phút
- 2.4. Rửa với dung dịch rửa đã pha loãng, lắc sạch nước.
- 2.5. Thêm Conjugate vào mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- 2.6. Rửa với dung dịch rửa đã pha loãng, lắc sạch nước.
- 2.7. Nhỏ TMB vào mỗi giếng ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- 2.8. Nhỏ Stop Solution.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đọc kết quả

Cài đặt bước sóng máy đọc là 450nm/650nm-620nm.

Đọc kết quả theo hướng dẫn của bộ kit.

2. Kiểm tra chất lượng

- Kiểm tra chất lượng cho phép đánh giá sự ổn định của bộ kit. Bộ kit không được sử dụng nếu bất kỳ chứng dương hoặc chứng âm vượt ra khỏi ngưỡng quy định.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Thực hiện sai các bước trong quy trình hướng dẫn.
- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/ huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxid hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.

74. Định danh vi sinh vật bằng kỹ thuật PCR lồng đa tác nhân

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt của một số căn nguyên vi sinh vật thường gặp trực tiếp từ các bệnh phẩm lâm sàng.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật PCR lồng đa môi.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

Phương tiện, hóa chất như ví dụ dưới đây hoặc tương đương.

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Hệ thống FilmArray phần mềm
- FilmArray Pouch Loading Station
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-----------------------------------|--------|
| 1 | Bông | kg |
| 2 | Cồn | ml |
| 3 | Bơm kim tiêm | Cái |
| 4 | Panh | Cái |
| 5 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 6 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |

| | | |
|----|----------------------------------------------------------|------|
| 7 | Tube đựng bệnh phẩm | Cái |
| 8 | Găng không có bột | Cái |
| 9 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 10 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng | Test |
| 11 | Môi trường vận chuyển mẫu | Ống |
| 12 | Đầu côn 10 µl có lọc | Cái |
| 13 | Đầu côn 30 µl | Cái |
| 14 | Đầu côn 200 µl có lọc | Cái |
| 15 | Đầu côn 1 ml có lọc | Cái |
| 16 | Giấy thấm | Cuộn |
| 17 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 18 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 19 | Bút viết kính | Cái |
| 20 | Bút bi | Cái |
| 21 | Mũ | Cái |
| 22 | Khẩu trang | Cái |
| 23 | Găng tay | Đôi |
| 24 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 25 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 26 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 27 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 28 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 29 | Khăn lau tay | cái |
| 30 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu có)* | |

* Ghi chú:

Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Phân, dịch ty hầu, dịch não tủy.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. *Bước 1: Chuẩn bị túi hóa chất*

- Cho túi hóa chất vào trong trạm chuẩn bị mẫu
- Đặt lọ để tiêm mẫu bệnh phẩm (màu đỏ) vào giếng màu đỏ
- Đặt lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất (màu xanh) vào giếng màu xanh

2.2. *Bước 2: Hòa tan hóa chất*

- Xoáy để mở lọ chứa dung dịch hòa tan hóa chất
- Tiêm vào ống chứa dịch hòa tan của túi hóa chất
- Đợi tới khi hóa chất hòa tan trong tất cả các ống thì rút kim ra trả về lọ đựng dung dịch ban đầu.

2.3. *Bước 3: Trộn mẫu bệnh phẩm vào túi hóa chất*

- Thêm toàn bộ ống dung dịch đệm vào lọ để tiêm mẫu
- Dùng pipet chuyển mẫu bệnh phẩm vào trong lọ này
- Nắp chặt, bỏ ra khỏi giếng và trộn bằng cách lắc lên 3 lần
- Đặt lại vị trí giếng màu đỏ

2.4. *Bước 4: Nạp mẫu bệnh phẩm*

- Xoay vòng mở nắp kim của lọ tiêm mẫu
- Tiêm toàn bộ lọ vào giếng chuẩn đầu tiên
- Đẩy mạnh toàn bộ dung dịch vào trong túi hóa chất

2.5. *Bước 5: Bắt đầu chạy FilmArray*

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Phần mềm tự động mở bản báo cáo kết quả khi xét nghiệm hoàn tất.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Trong trường hợp không có sản phẩm PCR, cần phải kiểm tra lại quá trình tách chiết RNA tổng số, chất lượng primers và master mix, và thực hiện lại toàn bộ xét nghiệm.

75. Vi sinh vật nhiễm khuẩn não-màng não

Real-time PCR đa tác nhân

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định DNA/RNA đặc trưng của các vi sinh vật gây bệnh trong dịch não tủy của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy real-time PCR đa màu và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm lạnh
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ $5\ \mu\text{l}$ - $1000\ \mu\text{l}$.
- Đầu côn có phin lọc các thể tích từ $5\ \mu\text{l}$ - $1000\ \mu\text{l}$.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-------------------------------------------|--------|
| 1 | Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng | Cái |
| 2 | Găng không có bột tal (DNase-RNase free) | Đôi |
| 3 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Hóa chất và vật tư tiêu hao cho tách acid nucleic | Test |
| 8 | Tube eppendorff 1,5 ml | Cái |
| 9 | Strip 8 tubes 0,1 ml | Cái |
| 10 | Nắp đậy strip 8 tubes | Cái |
| 11 | Đầu cân có phin lọc 1 ml | Cái |
| 12 | Đầu cân có phin lọc 200 μ l | Cái |
| 13 | Đầu cân có phin lọc 30 μ l | Cái |
| 14 | Đầu cân có phin lọc 10 μ l | Cái |
| 15 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 16 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 18 | Bút viết kính | Cái |
| 19 | Bút bi | Cái |
| 20 | Mũ | Cái |
| 21 | Khẩu trang | Cái |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch não tủy.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết DNA/RNA (nếu cần).

2.2. Tách chiết DNA/RNA

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (đường biểu diễn dương tính) và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang cho chứng nội dương tính hoặc bằng và không vượt qua tín hiệu nền (đường biểu diễn âm tính).
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang chứng nội dương tính

2. Phân tích mẫu

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng tương ứng với màu của từng tác nhân và bắt đầu từ chu kỳ 45 trở về trước. Một mẫu có thể dương tính với 1 hoặc nhiều tác nhân.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và lớn hơn chu kỳ 45 → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn lặp lại thì trả lời kết quả dương tính. Nếu kết quả khác với lần đầu thì yêu cầu lấy lại mẫu bệnh phẩm khác để kiểm tra lại.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- 1. Sự cố:** Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.
- 2. Nguyên nhân:** Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.
- 3. Khắc phục:** Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu

76. Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp

Real-time PCR đa tác nhân

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định DNA/RNA đặc trưng của các vi sinh vật gây bệnh trong bệnh phẩm đường hô hấp của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy real-time PCR đa màu và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm lạnh
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ $5\ \mu\text{l}$ - $1000\ \mu\text{l}$.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-------------------------------------------|--------|
| 1 | Tăm bông vô trùng hoặc lọ đựng bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Găng không có bột tal (DNase-RNase free) | Đôi |
| 3 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 6 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Hóa chất và vật tư tiêu hao cho tách acid nucleic | Test |
| 8 | Tube eppendorff 1,5 ml | Cái |
| 9 | Strip 8 tubes 0,1 ml | Cái |
| 10 | Nắp đậy strip 8 tubes | Cái |
| 11 | Đầu cân có phin lọc 1 ml | Cái |
| 12 | Đầu cân có phin lọc 200 µl | Cái |
| 13 | Đầu cân có phin lọc 30 µl | Cái |
| 14 | Đầu cân có phin lọc 10 µl | Cái |
| 15 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 16 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 17 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 18 | Bút viết kính | Cái |
| 19 | Bút bi | Cái |
| 20 | Mũ | Cái |
| 21 | Khẩu trang | Cái |
| 22 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 23 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 24 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 25 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 26 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 27 | Khăn lau tay | Cái |
| 28 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Dịch mũi hầu, dịch ngoáy họng, dịch ty hầu, dịch hút phế quản, dịch rửa phế quản.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết DNA/RNA (nếu cần)

2.2. Tách chiết DNA/ RNA

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (đường biểu diễn dương tính) và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang cho chứng nội dương tính hoặc thẳng và không vượt qua tín hiệu nền (đường biểu diễn âm tính).

- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang chứng nội dương tính

2. Phân tích mẫu

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng tương ứng với màu của từng tác nhân và bắt đầu từ chu kỳ 42 trở về trước. Một mẫu có thể dương tính với 1 hoặc nhiều tác nhân.

- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và lớn hơn chu kỳ 42 → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn lặp lại thì trả lời kết quả dương tính. Nếu kết quả khác với lần đầu thì yêu cầu lấy lại mẫu bệnh phẩm khác để kiểm tra lại.

- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sự cố: Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

2. Nguyên nhân: Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

3. Khắc phục: Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

77. Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường ruột

Real-time PCR đa tác nhân

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định DNA/RNA đặc trưng của các loại vi sinh vật trong phân của người.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Máy real-time PCR đa màu và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm ≥ 12000 gpm/phút
- Máy ly tâm lạnh
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ $5\ \mu\text{l}$ - $1000\ \mu\text{l}$.
- Đầu côn có phin lọc các thể tích từ $5\ \mu\text{l}$ - $1000\ \mu\text{l}$.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-------------------------------------------|--------|
| 1 | Lọ đựng bệnh phẩm vô trùng | Cái |
| 2 | Tăm bông vô trùng | Cái |
| 3 | Găng không có bột tal (DNase-RNase free) | Đôi |

| | | |
|----|--------------------------------------------------------|------|
| 4 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 5 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Cái |
| 6 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 7 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng | Test |
| 8 | Hóa chất và vật tư tiêu hao cho tách acid nucleic | Test |
| 9 | Tube eppendorff 1,5 ml | Cái |
| 10 | Strip 8 tubes 0,1 ml | Cái |
| 11 | Nắp đậy strip 8 tubes | Cái |
| 12 | Đầu côn có phin lọc 1 ml | Cái |
| 13 | Đầu côn có phin lọc 200 µl | Cái |
| 14 | Đầu côn có phin lọc 30 µl | Cái |
| 15 | Đầu côn có phin lọc 10 µl | Cái |
| 16 | Giấy thấm không bụi | Cuộn |
| 17 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 18 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 19 | Bút viết kính | Cái |
| 20 | Bút bi | Cái |
| 21 | Mũ | Cái |
| 22 | Khẩu trang | Cái |
| 23 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 24 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 25 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 26 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 27 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 28 | Khăn lau tay | Cái |
| 29 | Ngoại kiểm (EQAS) (nếu thực hiện)* | |

* Ghi chú:

- Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Phân.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục 3).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết DNA/RNA (nếu cần)

2.2. Tách chiết DNA/RNA

2.3. Thực hiện phản ứng *real-time PCR*

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (đường biểu diễn dương tính) và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang cho chứng nội dương tính hoặc thẳng và không vượt qua tín hiệu nền (đường biểu diễn âm tính).
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang chứng nội dương tính

2. Phân tích mẫu

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng tương ứng với màu của từng tác nhân và bắt đầu từ chu kỳ 40 trở về trước. Một mẫu có thể dương tính với 1 hoặc nhiều tác nhân.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và lớn hơn chu kỳ 40 → thực hiện lại xét nghiệm. Nếu kết quả vẫn lặp lại thì trả lời kết quả dương tính. Nếu kết quả khác với lần đầu thì yêu cầu lấy lại mẫu bệnh phẩm khác để kiểm tra lại.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- 1. Sự cố:** Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.
- 2. Nguyên nhân:** Có thể mẫu âm thực sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.
- 3. Khắc phục:** Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

78. MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) định danh TRCReady

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Quy trình này mô tả các bước kỹ thuật xét nghiệm phát hiện *Mycobacterium tuberculosis* trên hệ thống TRCReady-80.

2. Nguyên lý

Kỹ thuật TRCReady MTB nhằm khuếch đại và phát hiện trình tự đích dựa trên sự kết hợp của phản ứng phiên mã ngược và phiên mã. Kỹ thuật TRC khuếch đại và phát hiện ARN đích trong cùng một bước thông qua sự kết hợp phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt ARN và đầu dò phát huỳnh quang hoạt động theo hình thức cài xen (Intercalation activating fluorescence- INAF). TRCReady MTB khuếch đại và phát hiện ARN 16S. Đồng thời, kit cũng chứa chứng nội để phát hiện chất ức chế phản ứng khuếch đại ARN. Phản ứng khuếch đại được phát hiện trong thời gian thực bằng cách đo mật độ huỳnh quang phát ra do sự liên kết của trình tự ARN đích với probe INAF. Các phản ứng được thực hiện ở điều kiện đẳng nhiệt 46°C.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh (và/hoặc sinh học phân tử/ sinh học/công nghệ sinh học).

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị

- Máy TRCReady-80
- Máy tính được cài sẵn phần mềm TRCReady-80
- Bộ lưu điện
- Đồng hồ bấm giờ
- Máy ly tâm tuýp 50 ml
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Máy ủ nhiệt khô (với giới hạn nhiệt độ >80°C)

- Máy ly tâm tuýp 1,5 ml (với lực ly tâm đạt 10000 g)
- Máy spindown (để ly tâm nhẹ, không bắt buộc)
- Máy in (không bắt buộc)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|-------------------------------------|--------|
| 1 | TRC MTB | test |
| 2 | TRCR Purification kit | test |
| 3 | TRCR MTB-Lysis reagent | test |
| 4 | TRCR TIP SET | test |
| 5 | KH ₂ PO ₄ | gam |
| 6 | Na ₂ HPO ₄ | gam |
| 7 | Nước cất | ml |
| 8 | NaOH | gam |
| 9 | NaCitrat | gam |
| 10 | NALC | mg |
| 11 | Cồn 70% | ml |
| 12 | Presept | viên |
| 13 | Microshiel | ml |
| 14 | Tuýp Falcon 50 ml | tuýp |
| 15 | Đầu côn 200 µl có lọc | cái |
| 16 | Đầu côn 1000 µl có lọc | cái |
| 17 | Tuýp 1,5 ml có nắp xoáy | cái |
| 18 | Giá cắm tuýp 1,5 ml | cái |
| 19 | Giá cắm tuýp 50 ml | cái |
| 20 | Khay đựng bệnh phẩm | cái |
| 21 | Khăn giấy | tờ |
| 22 | Khăn lau tay | cái |
| 23 | Găng tay không bột tan | đôi |
| 24 | Quần áo bảo hộ | cái |
| 25 | Quần áo công tác | bộ |
| 26 | Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm | cái |
| 27 | Thùng rác có nắp | cái |

| | | |
|----|-------------------------------------|-------|
| 28 | Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm | cái |
| 29 | Bút dạ | Cái |
| 30 | Bút bi | cái |
| 31 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | trang |
| 32 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 33 | Nội kiểm | |
| 34 | Ngoại kiểm | |

3. Bệnh phẩm

- Hầu hết các loại bệnh phẩm từ các tổn thương nghi lao. Ngoài ra, có thể dùng chủng nuôi cấy dương tính.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Xử lý bệnh phẩm: Khử nhiễm bệnh phẩm (nếu cần)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Phân giải (*lysis*)

2.2. Chuẩn bị hóa chất cho bước tách chiết và phát hiện

2.3. Chạy phản ứng

2.4. Xem kết quả

IV. Diễn giải và báo cáo kết quả

Kết quả của mẫu và chứng được phần mềm thể hiện ở ba cột: Judgement, Assay flag và Judgement flag. Kết quả của mẫu được phiên giải như sau:

| Judgement | Assay flag | Kết quả | Nguyên nhân |
|------------|------------------|----------------|------------------------------------|
| MTB | (để trống) | Dương tính | Tìm thấy gien đích trong mẫu |
| - | (để trống) | Âm tính | Không tìm thấy gien đích trong mẫu |
| F | (để trống) | Không xác định | Do kết quả của chứng không phù hợp |
| | (Báo lỗi bất kỳ) | | Xem mục 11.2 |
| (Để trống) | (để trống) | | Mất dữ liệu do lỗi kết nối |
| | (báo lỗi bất kỳ) | | Xem mục |

Kết quả của chứng được phiên giải như sau:

| Judgement | Assay flag | Kết quả | Nguyên nhân |
|------------|------------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Valid | (để trống) | Phù hợp | Tuýp được khai báo là chứng dương có kết quả dương tính Tuýp được khai báo là chứng âm cho kết quả âm tính |
| Invalid#1 | (để trống) | Không phù hợp | Tuýp được khai báo là chứng dương có kết quả âm tính Tuýp được khai báo là chứng âm không phát hiện thấy sự nhân lên của chứng nội trong khi không thấy sự nhân lên của gien đích. |
| Invalid#2 | (để trống) | | Tuýp được khai báo là chứng âm có kết quả dương tính |
| F | (báo lỗi bất kỳ) | Không xác định | Xem mục 11.2 |
| (Để trống) | (để trống) | | Mất dữ liệu do lỗi kết nối |
| | (Báo lỗi bất kỳ) | | Xem mục 11.2 |

V. SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

* Các trường hợp không phù hợp của chứng và cách xử lý

Chứng dương có kết quả Invalid#1, thực hiện các bước kiểm tra như sau:

| Bước | Cách xử lý |
|------|--------------------------------------------------------|
| 1 | Kiểm tra vị trí chứng dương có đúng như khai báo không |
| 2 | Kiểm tra điều kiện bảo quản có phù hợp không |

Chứng âm có kết quả Invalid#1, Invalid#2 thực hiện bước kiểm tra sau:

| Bước | Cách xử lý |
|------|-----------------------------------------------------|
| 1 | Kiểm tra vị trí chứng âm có đúng như khai báo không |

*Các thông báo lỗi khác: Tham khảo hướng dẫn của nhà sản xuất

79. MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) kháng INH nồng độ cao môi trường lỏng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định tính nhạy cảm và đề kháng với kháng sinh Isoniazid nồng độ 33,2 µg/ml của vi khuẩn lao

2. Nguyên lý

- Môi trường MGIT cung cấp dinh dưỡng cho sự phát triển của *Mycobacteria*. Hợp chất huỳnh quang gắn dưới đáy tuýp nhạy cảm với oxy hòa tan trong môi trường, khi có vi khuẩn mọc tiêu thụ oxy, hợp chất sẽ phát quang.

- Cho thêm kháng sinh vào môi trường để phát hiện tính kháng thuốc của vi khuẩn. Chủng vi khuẩn lao pha theo tỷ lệ qui định, cấy vào môi trường lỏng MGIT có và không có thuốc chống lao, nhập vào máy BACTEC MGIT.

- Hệ thống máy giám sát liên tục sự phát quang của tuýp cấy dựa vào đơn vị sinh trưởng (GU). Kết quả KSD được máy tự động phân tích và báo tín hiệu hiển thị trên màn hình, dựa trên so sánh sự phát triển của *M. tuberculosis* trong tuýp chứng và các tuýp có thuốc khi tuýp chứng đạt GU 400, ngưỡng kháng thuốc GU 100

+ Tuýp có thuốc GU dưới 100 là nhạy cảm. Tuýp có thuốc GU \geq 100 là kháng thuốc

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ ATSH loại 2A
- Máy vortex
- Nồi hấp tiệt trùng
- Tủ lạnh
- Đồng hồ phút
- Máy BACTEC MGIT

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất và vật tư tiêu hao | Đơn vị tính |
|------------|--------------------------------------------|--------------------|
| 1 | MGIT tuýp loại 7 ml | tuýp |
| 2 | MGIT supplement | ml |
| 3 | INH KIT | ml |
| 4 | Cồn 70 ⁰ | ml |
| 5 | Nước cất | ml |
| 6 | Presept 2,5 | viên |
| 7 | Microshiel | ml |
| 8 | MacFaland 1 | ống |
| 9 | MacFaland 0.5 | ống |
| 10 | Dung dịch rửa dụng cụ thủy tinh | ml |
| 11 | H2SO4 | ml |
| 12 | Potassium Kali dicromate | gam |
| 13 | Pipette Paster nhựa vô trùng | cái |
| 14 | Đầu côn nhựa loại 1ml có lọc | cái |
| 15 | Đầu côn nhựa loại 0,1 ml có lọc | cái |
| 16 | Tuýp lưu chủng | cái |
| 17 | Hộp lưu chủng | cái |
| 18 | Túi nilon loại 2 lit chịu nhiệt hấp | cái |
| 19 | Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm | cái |
| 20 | Khẩu trang N95 | cái |
| 21 | Găng tay cao su | đôi |
| 22 | Dung dịch tẩy rửa dụng cụ | ml |
| 23 | Thùng rác có nắp | cái |
| 24 | Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm | cái |
| 25 | Khay đựng bệnh phẩm | cái |
| 26 | Chổi rửa tuýp, dụng cụ | cái |
| 27 | Chai thủy tinh trung tính 1000ml | cái |
| 28 | Quần áo bảo hộ | cái |
| 29 | Quần áo công tác | bộ |

| | | |
|----|-----------------------------|-------|
| 30 | Khăn lau tay | cái |
| 31 | Găng sạch (tiêm) | đôi |
| 32 | Bút chì đen HB | Cái |
| 33 | Bút dạ | Cái |
| 34 | Bút bi | cái |
| 35 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | trang |
| 36 | Giấy trả kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 37 | Nội kiểm | |
| 38 | Ngoại kiểm | |

* Chú ý: - Chi phí nội kiểm được tính bằng 1/10 tổng chi phí hóa chất, dụng cụ, VTTT. Chi phí ngoại kiểm được tính từ PNX chuẩn quốc tế 35,000đ/XN.

3. Bệnh phẩm

Chủng *M.tuberculosis* thuần từ ống MGIT dương tính dưới 5 ngày tuổi hoặc chủng dương tính trên môi trường đặc dưới 14 ngày tuổi.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Chuẩn bị

1.1 Chuẩn bị chủng làm KSD

1.2. Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn

1.3. Chuẩn bị thuốc chống lao

Chuẩn bị thuốc chống lao từ bộ kit theo bảng sau

| Tên thuốc | Nồng độ đông khô µg | Thể tích dung môi ml | Nồng độ sau pha µg/ml | Thể tích thêm vào tuýp MGIT µl | Nồng độ trong tuýp MGIT µg/ml |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| INH nồng độ cao | | | | | |
| INH | 66.4 | 2 | 33.2 | 100 | 0.4 |

Lưu ý:

- Nếu thuốc bảo quản lạnh, để nhiệt độ phòng 15 phút trước khi pha
- Thuốc đã pha chia lượng nhỏ bảo quản lạnh -20⁰ C hoặc lạnh hơn trong 6 tháng, nhưng không quá hạn ghi trên nhãn thuốc.

2. Thực hiện kỹ thuật

- Chỉ định INH nồng độ cao, dán nhãn 2 tuýp MGIT 7 ml theo thứ tự: GC, INH và tuýp PNB (nếu cần)
- Thêm 0,8 ml BACTEC MGIT 960 SIRE Supplement cho mỗi tuýp.
- Thêm 100µl dung dịch thuốc vào các tuýp theo nhãn thuốc tương ứng, không cho thuốc vào tuýp GC.
- Thêm 166 µl dung dịch PNB (nồng độ 25 mg/ml) vào tuýp dán nhãn PNB (nếu cần)
- Cấy 0,5 ml huyền dịch vi khuẩn tỉ lệ 1:100 vào tuýp GC.
- Cấy 0,5ml huyền dịch vi khuẩn tỉ lệ 1:5 hoặc tương đương vào mỗi tuýp có thuốc và tuýp PNB. Vặn chặt nắp và đảo ngược tuýp 3-4 lần.
- Nhập giá AST vào máy BACTEC MGIT
- Tuýp PNB nhập máy riêng như 1 ống cấy thông thường.

IV. Nhận định kết quả

- Máy tự động đọc kết quả. Khi có tín hiệu máy báo, lấy bộ AST ra khỏi máy, quét mã vạch, in kết quả KSD
- Kết quả KSD: Nhạy (S); kháng (R), và lỗi (X).
- + Kết quả nhạy khi tuýp có thuốc GU dưới 100
- + Kết quả kháng khi tuýp có thuốc GU > = 100
- + Lỗi (X): E 400 và E 200 có thể do pha huyền dịch vi khuẩn đặc hoặc vi khuẩn tạo cụm, chủng ngoại nhiễm, chủng **mix mycobacteria** hoặc chủng kháng thuốc mọc chậm hoặc huyền dịch vi khuẩn loãng.

V. Sai sót và xử trí

1. Sai sót

- Do chủng nhiễm, vi khuẩn tạo thành cụm trong huyền dịch, pha huyền dịch đặc; do pha huyền dịch loãng hoặc chủng kháng thuốc mọc chậm.
- Ống PNB dương tính chủng làm KSD không phải MTB hoặc chủng lẫn
- Chất lượng kháng sinh: pha không chuẩn, bảo quản sai...
- Nhiễm chéo trong quá trình thao tác kỹ thuật.
- Thực hành không an toàn.

2. Xử lý

- Chủng pha đặc hoặc loãng cần làm lại KSD
- Chủng nhiễm cần xử lý cấy lại thuần chủng
- Chủng lẫn cần phân lập hoặc chuyển phương pháp SHPT
- Chủng NTM không làm KSD với thuốc lao.

80. MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) định danh TB-LAMP

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Là quy trình phát hiện *Mycobacterium tuberculosis* complex từ ADN tách chiết của mẫu đờm của Người bệnh có triệu chứng nghi lao.

2. Nguyên lý

Quy trình dựa trên phản ứng nhân gen đẳng nhiệt, LAMP (loop- mediated Isothermal Amplication).

Phương pháp LAMP có các đặc tính sau:

- Chỉ 1 loại enzyme được sử dụng và phản ứng trong điều kiện đẳng nhiệt
- Độ đặc hiệu rất cao do bởi sử dụng 4 đoạn mồi nhận biết 6 vùng riêng biệt trên trình tự đích
- Hiệu quả khuếch đại cao cho phép thời gian khuếch đại ngắn
- Quy trình tạo ra 1 số lượng lớn sản phẩm nhân gen cho phép phát hiện bằng mắt thường

Các đoạn mồi được thiết kế dựa trên trình tự vùng *gyrB* và IS của vi khuẩn lao.

Việc phát hiện ADN khuếch đại dựa trên độ đục của phản ứng và được quan sát dưới ánh sáng UV.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ xét nghiệm .
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất

Phương tiện, hóa chất như ví dụ dưới đây hoặc tương đương.

2.1. Trang thiết bị

Tủ an toàn sinh học cấp I (nếu có)

Pipét chuyên dụng của Loopamp

Máy vortex

Máy trộn mẫu chuyên dụng của Loopamp

Máy PCR chuyên dụng của Loopamp (LF160)

Tủ lạnh 2-8⁰C

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|----------------------------------------------------|--------|
| 1 | Cốc đờm đáy bằng | cái |
| 2 | Đầu tip tiệt trùng chuyên dụng Loopamp | ml |
| 3 | Đồng hồ | Cái |
| 4 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 5 | Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm chất lượng | Test |
| 6 | Chứng ngoại kiểm dương (nếu có) | µl |
| 7 | Ngoại kiểm (nếu có)* | |
| 8 | Nước cất hai lần | ml |
| 9 | Giấy thấm | Cuộn |
| 10 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 11 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 12 | Bút viết kính | Cái |
| 13 | Bút bi | Cái |
| 14 | Mũ | Cái |
| 15 | Khẩu trang | Cái |
| 16 | Găng tay latex không bột, tiệt trùng | Cái |
| 17 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 18 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 19 | Dung dịch nước rửa tay | ml |
| 20 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 21 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 22 | Khăn lau tay | Cái |

*Ghi chú: Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/50 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm trung bình 3 lần/1 năm).

3. Bệnh phẩm

Là mẫu đờm nhày mũi, không lẫn máu, chặn thức ăn

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

Chuẩn bị mẫu & ủ nhiệt

Tách chiết ADN

Phản ứng LAMP

1. Chuẩn bị mẫu

- Đánh số trên mẫu bệnh phẩm và tuýp ủ nhiệt, mỗi mẻ kèm theo một chứng âm.
- Dùng pipét chuyên dụng của hãng cung cấp hút 60 µl đờm hoặc cặn mẫu đờm đã xử lý bằng NALC-NaOH cho vào tuýp ủ nhiệt.
- Tiến hành ủ tuýp ủ nhiệt ở 90⁰C (± 5⁰C), trước khi ủ lộn ngược tuýp vài lần.

2. Tách chiết ADN

- Để tuýp ủ nhiệt nguội 3 phút, lộn ngược tuýp 3 lần.
- Lấy nắp tuýp hóa chất tách chiết ra khỏi thân để thẳng đứng vào giá và thay thế bằng tuýp ủ nhiệt, lắc thật mạnh đến tan (I).
- Chuẩn bị ống phản ứng LAMP (chuẩn bị đủ số mẫu và 1 chứng âm, 1 chứng dương)
- Lắp đầu lọc tách chiết ADN vào (I), bóp mạnh để thu ADN vào tuýp phản ứng LAMP (thể tích ADN nằm trong ngưỡng đánh dấu trên tuýp phản ứng).
- Sau mỗi mẫu đóng nắp tuýp, lặp lại với các ống tiếp theo.
- Chuyển toàn bộ các mẫu đã chuẩn bị và chứng dương lên máy lắc chuyên dụng trong 2 phút và Spindown mẫu 10 giây.

3. Phản ứng LAMP

- Chuyển mẫu vào máy PCR chuyên dụng LAMP, chạy phản ứng trong 40 phút tại 67⁰C (thêm 5 phút cuối ở 80⁰C).
- Nhấc tuýp ra khỏi máy PCR và đặt tuýp vào khay đọc kết quả huỳnh quang.
- Bật đèn và so sánh mức độ phát sáng của mẫu với chứng âm và chứng dương.
- Ghi chép lại kết quả xét nghiệm.
- Vệ sinh khu vực làm việc bằng Hypochlorit sodium 0,5% và làm sạch lại bằng nước cất hoặc cồn 70%.

IV. DIỄN GIẢI VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ

- Kiểm tra chất lượng bằng chứng âm và chứng dương.
- + Chứng âm: Không phát sáng dưới ánh sáng huỳnh quang.
- + Chứng dương: Phát sáng dưới ánh sáng huỳnh quang.

Tất cả các mẻ xét nghiệm đều thực hiện chứng âm và chứng dương. Chỉ trong trường hợp kết quả hai chứng như mô tả ở trên thì kết quả xét nghiệm các mẫu mới được chấp nhận.

- Khi quan sát dưới đèn huỳnh quang:

+ Phát quang: Mẫu dương tính: Có vi khuẩn lao.

+ Không phát quang: Mẫu âm tính: Không có vi khuẩn lao.

V. SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Máy báo lỗi khi bệnh phẩm lẫn máu và thức ăn: sàng lọc kĩ bệnh phẩm trước khi làm xét nghiệm.

81. MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) kháng thuốc MIC trên môi trường lỏng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của Bedaquiline, và 11 thuốc lao bao gồm nhóm thuốc lao hàng 1 (Isoniazid, Rifampicin và Ethambutol), các thuốc nhóm Fluoroquinolones (Ofloxacin, Levofloxacin và Moxifloxacin), nhóm thuốc tiêm hàng 2 (Amikacin, Kanamycin, Capreomycin) và các thuốc chống lao nhóm 5 (Linezolid, Clofazimine) với *Mycobacterium tuberculosis*.

trên môi trường lỏng

2. Nguyên lý

Huyền dịch vi khuẩn được cấy vào môi trường không thuốc và môi trường chứa thuốc kháng sinh theo các nồng độ khác nhau. Xác định môi trường có nồng độ thuốc kháng sinh thấp nhất mà vi khuẩn không mọc, đây chính là nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của thuốc với vi khuẩn.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2A.
- Tủ ấm
- Tủ lạnh.
- Tủ âm sâu.
- Máy Vortex
- Máy đo độ đục.
- Nồi hấp tiệt trùng.
- pipet tự động 200ul, 1000ul.
- Pipet tự động đa kênh (2-200ul),
- Pipet aid (Thiết bị hỗ trợ hút pipet)
- Kính đảo ngược chiều ánh sáng.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị tính |
|------------|------------------------------------------|--------------------|
| 1 | Bộ Kit chuẩn panel 96 giếng | đĩa |
| 2 | phoenix ID Brorth | tubes |
| 3 | Tubes nước muối + tween | tubes |
| 4 | MacFaland số 1, | ống |
| 4 | MacFaland số 0.25 | ống |
| 4 | MacFaland số 0.5 | ống |
| 4 | MacFaland số 4.0 | ống |
| 6 | Cồn 70 ⁰ | ml |
| 8 | Presept 2,5 | viên |
| 9 | Microshiel | ml |
| 11 | Dung dịch rửa dụng cụ thủy tinh | ml |
| 1 | pipet đa kênh | cái |
| 2 | Đầu côn 200 µl | cái |
| 2 | Đầu côn 1000 µl | cái |
| 3 | Pipette nhựa 20ml | cái |
| 4 | Pipette nhựa 3ml | cái |
| 6 | Tuýp thủy tinh trung tính đáy tròn | cái |
| 7 | Bi thủy tinh 3 mm | viên |
| 8 | Tuýp lưu chủng | cái |
| 9 | Hộp lưu chủng | cái |
| 10 | Túi nilon loại 2 lit chịu nhiệt hấp | cái |
| 11 | Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm | cái |
| 12 | Thùng rác có nắp | cái |
| 13 | Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm | cái |
| 14 | Gía đựng tuýp | cái |
| 15 | Chổi rửa tuýp, dụng cụ | cái |
| 16 | Chai thủy tinh trung tính 1000ml | cái |
| 17 | Khăn lau tay | cái |
| 18 | Găng sạch | đôi |

| | | |
|----|---------------------------|-------|
| 19 | Găng hộ lý | đôi |
| 20 | Quần áo bảo hộ | cái |
| 21 | Quần áo công tác | bộ |
| 22 | Bút chì đen HB | Cái |
| 23 | Bút dạ | Cái |
| 24 | Bút bi | cái |
| 25 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | trang |

* Ghi chú: Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/10 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm 1 lần /năm từ PNX chuẩn quốc tế 35,000đ/XN)

3. Bệnh phẩm

Chủng *M.tuberculosis* thuần, tuổi chủng từ 21 ngày đến 28 ngày.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Chuẩn bị đĩa môi trường

2. Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn.

3. Cấy huyền dịch vi khuẩn vào đĩa môi trường.

IV. DIỄN GIẢI VÀ BÁO CÁO KẾT QUẢ

- Đọc kết quả Kháng sinh đồ ngày thứ 10. Nếu kết quả chưa rõ ràng, đọc kết luận ở ngày thứ 14.

- *Bước 1:* Đặt đĩa môi trường lên kính đảo chiều. Đầu tiên kiểm tra giếng chứng dương, giếng chứng âm, (giếng chứng dương phải có vi khuẩn mọc, giếng chứng âm phải không có vi khuẩn mọc). Sau đó đọc kết quả ở các giếng kháng sinh từ trái qua phải, từ trên xuống dưới. Ghi nhận các giếng có vi khuẩn mọc và tích dấu X vào ô tương ứng trong bảng dưới: (Trong quá trình đọc, so sánh với giếng chứng dương và chứng âm).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|--------------|
| A | BDQ 0.008 | BDQ 0.015 | BDQ 0.03 | BDQ 0.06 | BDQ 0.12 | BDQ 0.25 | BDQ 0.5 | BDQ 1 | BDQ 2 | BDQ 4 | RIF 0.06 | RIF 0.12 |
| B | RIF 0.25 | RIF 0.5 | RIF 1 | RIF 2 | RIF 4 | INH 0.03 | INH 0.06 | INH 0.12 | INH 0.25 | INH 0.5 | INH 1 | INH 2 |
| C | INH 4 | INH 8 | INH 16 | OFL 0.12 | OFL 0.25 | OFL 0.5 | OFL 1 | OFL 2 | OFL 4 | OFL 8 | LEVO 0.12 | LEVO 0.25 |
| D | LEVO 0.5 | LEVO 1 | LEVO 2 | LEVO 4 | MXF 0.06 | MXF 0.12 | MXF 0.25 | MXF 0.5 | MXF 1 | MXF 2 | MXF 4 | KAN 0.12 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------|------------|-----------|-------------|-------------|------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| E | KAN 0.25 | KAN 0.5 | KAN 1 | KAN 2 | KAN 4 | KAN 8 | KAN 16 | AMI 0.12 | AMI 0.25 | AMI 0.5 | AMI 1 | AMI 2 |
| F | AMI 4 | AMI 8 | AMI 16 | CAP 0.12 | CAP 0.25 | CAP 0.5 | CAP 1 | CAP 2 | CAP 4 | CAP 8 | CAP 16 | LZD 0.12 |
| G | LZD 0.25 | LZD 0.5 | LZD 1 | LZD 2 | LZD 4 | LZD 8 | CFZ 0.015 | CFZ 0.03 | CFZ 0.06 | CFZ 0.12 | CFZ 0.25 | POS |
| H | CFZ 0.5 | CFZ 1 | CFZ 2 | CFZ 4 | EMB 0.25 | EMB 0.5 | EMB 1 | EMB 2 | EMB 4 | EMB 8 | EMB 16 | NEG |

Sơ đồ đọc kết quả kháng sinh đồ trên môi trường lỏng

- *Bước 2*: Kết luận kết quả MIC của mỗi loại kháng sinh vào file dưới. Ghi nhận kết quả MIC ở nồng độ thấp nhất mà vi khuẩn không mọc được. Nếu ở nồng độ thấp nhất mà vi khuẩn không mọc thì ghi nhận kết quả MIC \leq giá trị đó. Nếu ở nồng độ cao nhất mà vi khuẩn vẫn còn mọc thì ghi nhận MIC $>$ giá trị đó.

Chú ý: Ví dụ trong dãy nồng độ của Bedaquiline, vi khuẩn mọc ở các giếng có nồng độ kháng sinh 0.008, 0.015, 0.03ug/ml. Giếng 0.06ug/ml vi khuẩn không mọc. Nhưng giếng 0.12ug/ml vi khuẩn lại mọc. Và các giếng tiếp theo 0.25, 0.5, 1, 2ug/ml vi khuẩn không mọc. Hiện tượng này gọi là “bỏ giếng” ở 0.06ug/ml. Khi đó, ta ghi nhận giá trị MIC là 0.25ug/ml.

V SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Pha huyền dịch vi khuẩn loãng hoặc đặc
- Bảo quản môi trường không đúng
- Nhiễm chéo trong quá trình thao tác kỹ thuật.
- Thực hành không an toàn.

2. *Xử lý*: Tuân thủ nghiêm ngặt quy trình.

82. MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) kháng thuốc Bedaquiline MIC trên môi trường thạch

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nồng độ ức chế ức chế tối thiểu (MIC) của Bedaquiline trên môi trường thạch

2. Nguyên lý

Huyền dịch vi khuẩn được cấy vào môi trường không thuốc và môi trường chứa thuốc kháng sinh theo các nồng độ khác nhau. Xác định môi trường có nồng độ thuốc kháng sinh thấp nhất mà vi khuẩn không mọc, đây chính là nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của thuốc với vi khuẩn.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện:

- Người thực hiện: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương)

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2A
- Tủ chuẩn bị môi trường (clean bench).
- Tủ ấm
- Máy ủ nhiệt.
- Tủ lạnh.
- Tủ âm sâu.
- Máy Vortex
- Máy đo độ đục.
- Nồi hấp tiệt trùng.
- Cân điện tử.
- pipet tự động 200ul, 1000ul.
- Pipet aid (Thiết bị hỗ trợ hút pipet)

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm)

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị tính |
|-----|------------------------------------------------|-------------|
| 1 | Bedaquiline | gram |
| 2 | 7H11 agar | gram |
| 3 | Glycerol | ml |
| 4 | DMSO | ml |
| 5 | Cồn 70 ⁰ | ml |
| 6 | Nước cất | ml |
| 7 | Presept 2,5 | viên |
| 8 | Microshiel | ml |
| 9 | MacFaland số 1, 0.25, 0.5, 4.0 | ống |
| 10 | Dung dịch rửa dụng cụ thủy tinh | ml |
| 11 | phoenix ID Brorth | tubes |
| 12 | Tubes nước muối + tween | tubes |
| 13 | Chủng chuẩn quốc tế H37 Rv | ống |
| 14 | Đĩa Pertri (90mm), chất liệu nhựa Polystyrene. | đĩa |
| 15 | Tuýp 15ml chất liệu nhựa Polystyrene. | Cái |
| 16 | Pipet 5ml chất liệu nhựa Polystyrene. | Cái |
| 17 | Pipet 25ml chất liệu nhựa Polystyrene. | Cái |
| 18 | Túi plastic có khóa | Cái |
| 19 | que cấy nhựa vô trùng | Cái |
| 20 | Đầu cân 200 µl | Cái |
| 21 | Đầu cân 1000 µl | Cái |
| 22 | Eppendorf 1,5 ml | Cái |
| 23 | Tuýp thủy tinh trung tính đáy tròn | Cái |
| 24 | Pipette Paster nhựa vô trùng | Cái |
| 25 | Tuýp lưu chủng | Cái |
| 26 | Hộp lưu chủng | Cái |
| 27 | Tuýp thủy tinh trung tính nút xoáy | Cái |
| 28 | Bông thấm nước | gam |
| 29 | Bi thủy tinh 3 mm | viên |

| | | |
|----|-------------------------------------|-------|
| 30 | Túi nilon loại 2 lớp chịu nhiệt hấp | cái |
| 31 | Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm | cái |
| 32 | Thùng rác có nắp | cái |
| 33 | Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm | cái |
| 34 | Pipette nhựa 10ml | cái |
| 35 | Chai thủy tinh trung tính 1000ml | cái |
| 36 | Khay ủ ống cấy | cái |
| 37 | Giá cắm tuýp ống cấy | cái |
| 38 | Chổi rửa tuýp, dụng cụ | cái |
| 39 | Bình cầu 2000ml | cái |
| 40 | ống đong 500 ml | cái |
| 41 | ống đong 50 ml | cái |
| 42 | Cốc có mỏ 500ml | cái |
| 43 | Cốc có mỏ 200 ml | cái |
| 44 | Khăn lau tay | cái |
| 45 | Khẩu trang N95 | cái |
| 46 | Găng sạch | đôi |
| 47 | Găng tay hộ lý | đôi |
| 48 | Quần áo bảo hộ | bộ |
| 49 | Quần áo công tác | bộ |
| 50 | Bút chì | Cái |
| 51 | Bút dạ | Cái |
| 52 | Bút bi | cái |
| 53 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | trang |

* Ghi chú: Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) là 1/10 tổng chi phí dụng cụ, hóa chất, vật tư tiêu hao (với số lần ngoại kiểm 1 lần /năm từ PXN chuẩn quốc tế 35,000đ/XN)

3. Bệnh phẩm

Chủng *M.tuberculosis* thuần tuổi chủng từ 21 ngày đến 28 ngày.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Chuẩn bị thuốc Bedaquiline (BDQ)

2. Chuẩn bị môi trường đặc 7H11

3. Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn.

4. Cấy huyền dịch vi khuẩn vào môi trường đặc 7H11 và ủ ấm

IV. Diễn giải và báo cáo kết quả

- Đọc kết quả kháng sinh đồ ở ngày thứ 21.

- *Bước 1:* Kiểm tra kết quả KSD của chủng đối chứng H37Rv. Đầu tiên, kiểm tra số lượng khuẩn lạc trên các đĩa môi trường không chứa thuốc kháng sinh. Đạt tiêu chuẩn là 50 khuẩn lạc / đĩa 10^{-5} , 500 khuẩn lạc / đĩa 10^{-4} , 5000 khuẩn lạc / đĩa 10^{-3} . Sau đó, kiểm tra các đĩa môi trường chứa thuốc kháng sinh. Ghi nhận kết quả MIC ở đĩa môi trường có nồng độ thuốc thấp nhất mà không có khuẩn lạc mọc. Giá trị MIC của chủng H37Rv chấp nhận được trong khoảng 0.015 – 0.12 ug/ml. Nếu giá trị MIC của H37Rv nằm ngoài khoảng trên thì cần thực hiện lại KSD.

- *Bước 2:* Kiểm tra kết quả KSD của chủng MTB.

Ghi kết quả vào bảng sau:

(Ghi số lượng khuẩn lạc đếm được vào cột GC1, GC2, GC3. Đánh dấu X vào cột nồng độ thuốc mà vi khuẩn mọc).

| Number | Lab Number | Batch of Media | Date of Inoculation | Day 7 14 21 28 | | | | | | | | | | | | C Result (ug/l) | Comments | |
|--------|------------|----------------|---------------------|----------------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|-----|---|---|-----------------|----------|--|
| | | | | GC 1 | GC 2 | GC 3 | 0.008 | 0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | | | |
| H37Rv | | 15/01/2017 | 05/02/2017 | NHẬT | 480 | 45 | X | X | X | | | | | | | | 0.06 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

V SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Chuẩn bị môi trường không đạt chất lượng
- Pha thuốc không đúng nồng độ
- Pha huyền dịch vi khuẩn loãng hoặc đặc
- Chất lượng kháng sinh: pha không chuẩn, bảo quản sai...
- Nhiễm chéo trong quá trình thao tác kỹ thuật.
- Thực hành không an toàn.

2. Xử lý

- Giá trị MIC của chủng H37Rv chấp nhận được trong khoảng 0.015 – 0.12 ug/ml. Nếu giá trị MIC của H37Rv nằm ngoài khoảng trên thì cần thực hiện lại KSD.
- Chú ý: Số lượng khuẩn lạc trong các đĩa môi trường không chứa thuốc kháng sinh đạt tiêu chuẩn là 50 khuẩn lạc / đĩa 10^{-5} , 500 khuẩn lạc / đĩa 10^{-4} , 5000 khuẩn lạc / đĩa 10^{-3} . Số lượng khuẩn lạc chấp nhận được ở các đĩa môi trường như sau: 10-100 khuẩn lạc/ đĩa 10^{-5} , 100-1000 khuẩn lạc/ đĩa 10^{-4} , 1000-10000 khuẩn lạc/ đĩa 10^{-3} . Nếu số lượng khuẩn lạc nằm ngoài khoảng trên, kết quả kháng sinh đồ không đủ tin tưởng, cần thực hiện lại.

83. *Norovirus* test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện định tính nhanh sự có mặt của các kháng nguyên *Norovirus* Genogroup I (GI) và Genogroup II (GII) trong mẫu phân người.

2. Nguyên lý

Theo nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Nhân viên xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Người thực hiện đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất (Ví dụ hoặc tương đương):

2.1. Trang thiết bị:

- Tủ lạnh 4°C – 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C) (nếu có)
- Đồng hồ đo thời gian

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao (bao gồm nội kiểm, ngoại kiểm):

| STT | Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao | Đơn vị |
|-----|--------------------------------------------|--------|
| 1 | Lọ đựng bệnh phẩm | Cái |
| 2 | Panh | Cái |
| 3 | Khay đựng bệnh phẩm | Cái |
| 4 | Hộp vận chuyển bệnh phẩm | Test |
| 5 | Sinh phẩm chẩn đoán | Test |
| 6 | Khâu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng | Test |
| 7 | Dụng cụ xét nghiệm | Cái |
| 8 | Giấy thấm | Cuộn |
| 9 | Giấy xét nghiệm | Tờ |
| 10 | Sổ lưu kết quả xét nghiệm | Tờ |
| 11 | Bút viết kính | Cái |
| 12 | Bút bi | Cái |
| 13 | Mũ | Cái |

| | | |
|----|----------------------------|-----|
| 14 | Khẩu trang | Cái |
| 15 | Găng tay | Đôi |
| 16 | Găng tay xử lý dụng cụ | Đôi |
| 17 | Quần áo bảo hộ | Bộ |
| 18 | Dung dịch xà phòng rửa tay | ml |
| 19 | Cồn sát trùng tay nhanh | ml |
| 20 | Dung dịch khử trùng | ml |
| 21 | Khăn lau tay | Cái |

3. Bệnh phẩm: Phân

4. **Phiếu xét nghiệm:** Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

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

1. Lấy bệnh phẩm:

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục).

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm SD BIOLINE Norovirus (VD).

- Để mẫu, thuốc thử về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành xét nghiệm.
- Chuẩn bị test, đánh dấu tên Người bệnh hoặc mã bệnh phẩm trên test, xét nghiệm ngay khi lấy test ra ngoài.
- Lấy dung môi đến vạch và chuyển dung môi sang ống đựng mẫu (x 2 lần).
- Lấy một lượng phân khoảng 50-100 mg, sử dụng tăm bông lấy mẫu đã được cung cấp trong kit thử.
- Đưa tăm bông lấy mẫu vào ống đựng mẫu đã chứa dung môi.
- Nhúng tăm bông và xoay ít nhất 10 lần cho đến khi mẫu hòa tan trong dung môi và trong khi loại bỏ tăm bông cần ấn tăm bông lên thành ống nghiệm.
- Lấy khay thử ra khỏi túi nhôm và để lên bề mặt phẳng, khô.
- Đóng nắp nhỏ giọt vào ống đựng mẫu.
- Nhỏ 4 giọt (khoảng 100µl) vào giếng mẫu trên thanh thử.
- Đọc kết quả trong 15 phút. Không được đọc kết quả sau quá 15 phút.

III. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Một vạch màu sẽ xuất hiện ở phía bên trái cửa sổ đọc kết quả cho biết thanh thử hoạt động bình thường, đó là vạch chứng. Một vạch màu khác hiện lên ở phía bên phải cửa sổ đọc kết quả cho biết kết quả xét nghiệm, đây là vạch thử.

- **Kết quả âm tính:** Chỉ xuất hiện 1 vạch chứng trên cửa sổ đọc kết quả cho kết quả âm tính.
- **Kết quả dương tính:** Xuất hiện vạch thử và vạch chứng trên cửa sổ kết quả, không kể vạch nào xuất hiện trước, cho kết quả dương tính.
- **Kết quả không có giá trị:** Nếu không nhìn thấy vạch chứng C trên cửa sổ kết quả sau khi tiến hành xét nghiệm, kết quả được cho là không có giá trị. Có thể đã không tuân thủ đúng hướng dẫn sử dụng hoặc khay thử đã hết hạn. Nên làm lại xét nghiệm bằng 1 khay thử mới.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch màu tại vạch C).
- Xét nghiệm phải được tiến hành ngay sau khi lấy mẫu càng sớm càng tốt. Không được để mẫu phẩm ở nhiệt độ phòng trong thời gian dài.