

QUYẾT ĐỊNH
Về việc ban hành tài liệu
“Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh Y học”

BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

Căn cứ Luật khám bệnh, chữa bệnh năm 2009;

Căn cứ Nghị định số 63/2012/NĐ-CP ngày 31/8/2012 của Chính Phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Y tế;

Xét Biên bản họp của Hội đồng nghiệm thu Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh chuyên ngành Vi sinh Y học 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 Y học”, gồm 231 quy trình kỹ thuật.

Điều 2. Tài liệu “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh Y học” 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 Vi sinh Y học 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, Chánh Thanh tra Bộ, Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh, 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);
- Cổng thông tin điện tử BHYT;
- Website Cục KCB;
- Lưu VT, KCB.

KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG

Đã ký

Nguyễn Thị Xuyên

**DANH SÁCH CÁC QUY TRÌNH KỸ THUẬT
CHUYÊN NGÀNH VI SINH HỌC**

(Ban hành kèm theo Quyết định số: 26/QĐ-BYT ngày 03 tháng 01 năm 2014
của Bộ trưởng Bộ Y tế)

TT	TÊN QUY TRÌNH KỸ THUẬT
Danh mục xét nghiệm vi khuẩn	
	A. Vi khuẩn chung
1	Vi khuẩn nhuộm soi
2	Vi khuẩn test nhanh
3	Vi khuẩn nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường
4	Vi khuẩn nuôi cấy và định danh hệ thống tự động
5	Vi khuẩn nuôi cấy, định danh và kháng thuốc hệ thống tự động
6	Vi khuẩn kháng thuốc định tính
7	Vi khuẩn kháng thuốc hệ thống tự động
8	Vi khuẩn kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)
9	Vi khuẩn kháng sinh phối hợp
10	Vi khuẩn kỵ khí nuôi cấy và định danh
11	Vi khuẩn kháng định
12	Vi khuẩn định danh PCR
13	Vi khuẩn định danh giải trình tự gene
14	Vi khuẩn kháng thuốc PCR
15	Vi khuẩn kháng thuốc giải trình tự gene
16	Vi hệ đường ruột
	B. Mycobacteria
17	AFB trực tiếp nhuộm Ziehl-Neelsen
18	AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang
19	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> nuôi cấy môi trường lỏng
20	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> nuôi cấy môi trường đặc
21	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Mantoux
22	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kháng thuốc hàng 1 môi trường đặc
23	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kháng thuốc hàng 1 môi trường lỏng
24	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kháng thuốc hàng 2 môi trường đặc
25	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kháng thuốc hàng 2 môi trường lỏng
26	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kháng thuốc PZA môi trường lỏng
27	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> pyrazinamidase
28	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> định danh và kháng RMP Xpert
29	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> đa kháng LPA
30	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> siêu kháng LPA
31	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> PCR hệ thống tự động
32	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Real-time PCR
33	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> spoligotyping

34	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> RFLP typing
35	NTM (Non tuberculosis mycobacteria) nuôi cấy môi trường lỏng
36	NTM (Non tuberculosis mycobacteria) nuôi cấy môi trường đặc
37	NTM (Non tuberculosis mycobacteria) định danh LPA
38	<i>Mycobacterium leprae</i> nhuộm soi
39	<i>Mycobacterium leprae</i> PCR
40	<i>Mycobacterium leprae</i> mảnh sinh thiết
	C. <i>Vibrio cholerae</i>
41	<i>Vibrio cholerae</i> nhuộm soi
42	<i>Vibrio cholerae</i> nhuộm huỳnh quang
43	<i>Vibrio cholerae</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc
44	<i>Vibrio cholerae</i> PCR
45	<i>Vibrio cholerae</i> giải trình tự gene
	D. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
46	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> nhuộm soi
47	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc
48	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PCR
49	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Real-time PCR
	E. <i>Neisseria meningitidis</i>
50	<i>Neisseria meningitidis</i> nhuộm soi
51	<i>Neisseria meningitidis</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc
52	<i>Neisseria meningitidis</i> PCR
53	<i>Neisseria meningitidis</i> Real-time PCR
	F. Các vi khuẩn khác
54	<i>Chlamydia</i> test nhanh
55	<i>Chlamydia</i> nhuộm huỳnh quang
56	<i>Chlamydia</i> Ab miễn dịch bán tự động
57	<i>Chlamydia</i> PCR
58	<i>Chlamydia</i> Real-time PCR
59	<i>Chlamydia</i> Real-time PCR hệ thống tự động
60	<i>Clostridium</i> nuôi cấy, định danh
61	<i>Clostridium difficile</i> miễn dịch bán tự động
62	<i>Clostridium difficile</i> PCR
63	<i>Leptospira</i> test nhanh
64	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Real-time PCR
65	<i>Mycoplasma hominis</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc
66	<i>Rickettsia</i> Ab miễn dịch bán tự động
67	<i>Salmonella</i> Widal
68	<i>Streptococcus pyogenes</i> ASO
69	<i>Treponema pallidum</i> soi tươi
70	<i>Treponema pallidum</i> nhuộm soi
71	<i>Treponema pallidum</i> RPR định tính và định lượng
72	<i>Treponema pallidum</i> TPHA định tính và định lượng
73	<i>Ureaplasma urealyticum</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc
Danh mục xét nghiệm virus	

	A. Virus chung
74	Virus test nhanh
75	Virus Ag miễn dịch bán tự động
76	Virus Ab miễn dịch bán tự động
	B. Hepatitis virus
77	HBsAg test nhanh
78	HBsAg miễn dịch bán tự động
79	HBsAg miễn dịch tự động
80	HBsAg kháng định
81	HBsAg định lượng
82	HBsAb miễn dịch bán tự động
83	HBsAb định lượng
84	HBc IgM miễn dịch bán tự động
85	HBc IgM miễn dịch tự động
86	HBc total miễn dịch bán tự động
87	HBc total miễn dịch tự động
88	HBeAg miễn dịch bán tự động
89	HBeAg miễn dịch tự động
90	HBeAb miễn dịch bán tự động
91	HBeAb miễn dịch tự động
92	HBV đo tải lượng Real-time PCR
93	HBV đo tải lượng hệ thống tự động
94	HBV genotype PCR
95	HBV genotype Real-time PCR
96	HBV genotype giải trình tự gene
97	HBV kháng thuốc Real-time PCR (cho 1 loại thuốc)
98	HBV kháng thuốc giải trình tự gene
99	HCV Ab miễn dịch bán tự động
100	HCV Ab miễn dịch tự động
101	HCV Ag/Ab miễn dịch bán tự động
102	HCV Core Ag miễn dịch tự động
103	HCV PCR
104	HCV đo tải lượng Real-time PCR
105	HCV đo tải lượng hệ thống tự động
106	HCV genotype Real-time PCR
107	HCV genotype giải trình tự gene
108	HAV IgM miễn dịch bán tự động
109	HAV IgM miễn dịch tự động
110	HAV total miễn dịch bán tự động
111	HAV total miễn dịch tự động
112	HDV Ag miễn dịch bán tự động
113	HDV IgM miễn dịch bán tự động
114	HDV Ab miễn dịch bán tự động
115	HEV IgM test nhanh
116	HEV IgM miễn dịch bán tự động

	C. HIV
117	HIV Ab test nhanh
118	HIV Ag/Ab test nhanh
119	HIV Ab miễn dịch bán tự động
120	HIV Ag/Ab miễn dịch bán tự động
121	HIV Ag/Ab miễn dịch tự động
122	HIV khẳng định
123	HIV đo tải lượng Real-time PCR
124	HIV đo tải lượng hệ thống tự động
125	HIV genotype giải trình tự gene
126	HIV kháng thuốc giải trình tự gene
	D. Dengue virus
127	Dengue virus NS1Ag test nhanh
128	Dengue virus NS1Ag/IgM/IgG test nhanh
129	Dengue virus IgM/IgG test nhanh
130	Dengue virus IgM miễn dịch bán tự động
131	Dengue virus IgG miễn dịch bán tự động
132	Dengue virus PCR
133	Dengue virus serotype PCR
	E. Herpesviridae
134	CMV IgM miễn dịch bán tự động
135	CMV IgM miễn dịch tự động
136	CMV IgG miễn dịch bán tự động
137	CMV IgG miễn dịch tự động
138	CMV PCR
139	CMV Real-time PCR
140	CMV đo tải lượng hệ thống tự động
141	CMV Avidity
142	HSV 1+2 IgM miễn dịch bán tự động
143	HSV 1+2 IgG miễn dịch bán tự động
144	HSV Real-time PCR
145	VZV Real-time PCR
146	EBV-VCA IgM miễn dịch bán tự động
147	EBV-VCA IgG miễn dịch bán tự động
148	EBV EA-D IgG miễn dịch bán tự động
149	EBV EB-NA IgG miễn dịch bán tự động
150	EBV PCR
151	EBV Real-time PCR
	E. Enterovirus
152	EV71 PCR
153	EV71 Real-time PCR
154	EV71 genotype giải trình tự gene
155	Enterovirus PCR
156	Enterovirus genotype giải trình tự gene
	F. Các virus khác

157	Adenovirus Real-time PCR
158	BK/JC virus PCR
159	HPV PCR
160	HPV Real-time PCR
161	HPV genotype Real-time PCR
162	HPV genotype PCR hệ thống tự động
163	HPV genotype giải trình tự gene
164	Influenza virus A, B test nhanh
165	Influenza virus A, B Real-time PCR
166	Influenza virus A, B giải trình tự gene
167	JEV IgM miễn dịch bán tự động
168	Measles virus Ab miễn dịch bán tự động
169	Rotavirus test nhanh
170	RSV Ab miễn dịch bán tự động
171	RSV Real-time PCR
172	Rubella virus IgM miễn dịch bán tự động
173	Rubella virus IgM miễn dịch tự động
174	Rubella virus IgG miễn dịch bán tự động
175	Rubella virus IgG miễn dịch tự động
176	Rubella virus PCR
177	Rubella virus giải trình tự gene
Danh mục xét nghiệm KST	
A. Ký sinh trùng trong phân	
178	Hồng cầu, bạch cầu trong phân soi tươi
179	Hồng cầu trong phân test nhanh
180	Đơn bào đường ruột soi tươi
181	Đơn bào đường ruột nhuộm soi
182	Trứng giun, sán soi tươi
183	Trứng giun soi tập trung
184	<i>Strongyloides stercoralis</i> (giun lươn) ấu trùng soi tươi
B. Ký sinh trùng trong máu	
185	<i>Angiostrogylus cantonensis</i> (Giun tròn chuột) Ab miễn dịch bán tự động
186	<i>Clonorchis/Opisthorchis</i> (Sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch bán tự động
187	<i>Cysticercus cellulosae</i> (Sán lợn) Ab miễn dịch bán tự động
188	<i>Entamoeba histolytica</i> (Amip) Ab miễn dịch bán tự động
189	<i>Fasciola</i> (Sán lá gan lớn) Ab miễn dịch bán tự động
190	<i>Filaria</i> (Giun chỉ) ấu trùng trong máu nhuộm soi
191	<i>Gnathostoma</i> Ab miễn dịch bán tự động
192	<i>Plasmodium</i> (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định tính
193	<i>Plasmodium</i> (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định lượng
194	<i>Plasmodium</i> (Ký sinh trùng sốt rét) Ag test nhanh
195	<i>Strongyloides stercoralis</i> (Giun lươn) Ab miễn dịch bán tự động

196	<i>Toxocara</i> (Giun đũa chó, mèo) Ab miễn dịch bán tự động
197	<i>Toxoplasma</i> IgM miễn dịch tự động
198	<i>Toxoplasma</i> IgG miễn dịch tự động
199	<i>Toxoplasma</i> Avidity
	C. Ký sinh trùng ngoài da
200	<i>Demodex</i> soi tươi
201	<i>Demodex</i> nhuộm soi
202	<i>Phthirus pubis</i> (Rận mu) soi tươi
203	<i>Phthirus pubis</i> (Rận mu) nhuộm soi
204	<i>Sarcoptes scabies hominis</i> (Ghẻ) soi tươi
205	<i>Sarcoptes scabies hominis</i> (Ghẻ) nhuộm soi
	D. Ký sinh trùng trong các bệnh phẩm khác
206	<i>Cysticercus cellulosae</i> (Sán lợn) ấu trùng soi mảnh sinh thiết
207	<i>Gnathostoma</i> ấu trùng soi mảnh sinh thiết
208	<i>Pneumocystis jirovecii</i> nhuộm soi
209	<i>Taenia</i> (Sán dây) soi tươi định danh
210	<i>Toxocara</i> (Giun đũa chó, mèo) soi mảnh sinh thiết
211	<i>Trichinella spiralis</i> (Giun xoắn) soi mảnh sinh thiết
212	<i>Trichomonas vaginalis</i> soi tươi
213	<i>Trichomonas vaginalis</i> nhuộm soi
	Danh mục xét nghiệm Vi nấm
214	Vi nấm soi tươi
215	Vi nấm test nhanh
216	Vi nấm nhuộm soi
217	Vi nấm nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường
218	Vi nấm nuôi cấy và định danh hệ thống tự động
219	Vi nấm nuôi cấy, định danh và kháng thuốc hệ thống tự động
220	Vi nấm kháng định
221	Vi nấm kháng thuốc định lượng (MIC) (cho 1 loại kháng sinh)
222	Vi nấm PCR
223	Vi nấm giải trình tự gene
	Danh mục xét nghiệm đánh giá nhiễm khuẩn bệnh viện
224	Vi sinh vật cấy kiểm tra không khí
225	Vi sinh vật cấy kiểm tra bàn tay
226	Vi sinh vật cấy kiểm tra dụng cụ đã tiệt trùng
227	Vi sinh vật cấy kiểm tra bề mặt
228	Vi sinh vật cấy kiểm tra nước sinh hoạt
229	Vi sinh vật cấy kiểm tra nước thải
230	Vi khuẩn kháng thuốc - Phát hiện người mang
231	Vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện - Phát hiện nguồn nhiễm

(Tổng số 231 quy trình kỹ thuật)

**KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG**

Nguyễn Thị Xuyên

MỤC LỤC

XÉT NGHIỆM VI KHUẨN

1. Vi khuẩn nhuộm soi	1
2. Vi khuẩn test nhanh.....	4
3. Vi khuẩn nuôi cấy và định danh phương pháp thông thường.....	7
4. Vi khuẩn nuôi cấy, định danh hệ thống tự động	10
5. Vi khuẩn nuôi cấy, định danh và kháng thuốc hệ thống tự động	14
6. Vi khuẩn kháng thuốc định tính.....	18
7. Vi khuẩn kháng thuốc hệ thống tự động	21
8. Vi khuẩn kháng thuốc định lượng MIC (cho 1 loại kháng sinh).....	24
9. Vi khuẩn kháng sinh phối hợp	28
10. Vi khuẩn kỵ khí nuôi cấy và định danh	31
11. Vi khuẩn khẳng định	34
13. Vi khuẩn định danh giải trình tự gene.....	40
14. Vi khuẩn kháng thuốc PCR.....	44
15. Vi khuẩn kháng thuốc giải trình tự gene.....	47
16. Vi hệ đường ruột	51
17. AFB trực tiếp nhuộm Ziehl-Neelsen.....	54
18. AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang.....	58
19. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> nuôi cấy môi trường lỏng	61
20. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> nuôi cấy môi trường đặc.....	66
21. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Mantoux	71
22. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kháng thuốc hàng 1 môi trường đặc.....	74
23. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kháng thuốc hàng 1 môi trường lỏng	79
24. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kháng thuốc hàng 2 môi trường đặc.....	83
25. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kháng thuốc hàng 2 môi trường lỏng	88
26. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kháng thuốc PZA môi trường lỏng	92
27. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pyrazinamidase.....	96
28. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> định danh và kháng RMP XPERT	99
29. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> đa kháng LPA.....	102
30. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> siêu kháng LPA	107
31. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> PCR hệ thống tự động	113

32. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Real-time PCR	116
33. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Spoligotyping	120
34. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> RFLP typing	125
35. NTM (Non Tuberculosis Mycobacteria) nuôi cấy môi trường lỏng	131
36. NTM (Non Tuberculosis Mycobacteria) nuôi cấy môi trường đặc	136
37. NTM (Non Tuberculosis Mycobacteria) LPA	141
38. <i>Mycobacterium leprae</i> nhuộm soi	145
39. <i>Mycobacterium leprae</i> PCR	148
40. <i>Mycobacterium leprae</i> mảnh sinh thiết	152
41. <i>Vibrio cholerae</i> nhuộm soi	154
42. <i>Vibrio cholerae</i> nhuộm huỳnh quang	157
43. <i>Vibrio cholerae</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc	160
44. <i>Vibrio cholerae</i> PCR	163
45. <i>Vibrio cholerae</i> giải trình tự gene	166
46. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> nhuộm soi	169
47. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc	172
48. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> PCR	175
49. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Real-time PCR	178
50. <i>Neisseria meningitidis</i> nhuộm soi	182
51. <i>Neisseria meningitidis</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc	185
52. <i>Neisseria meningitidis</i> PCR	188
54. <i>Chlamydia</i> test nhanh	195
55. <i>Chlamydia</i> nhuộm huỳnh quang	198
56. <i>Chlamydia</i> Ab miễn dịch bán tự động	201
57. <i>Chlamydia</i> PCR	205
58. <i>Chlamydia</i> Real-time PCR	209
59. <i>Chlamydia</i> Real-time PCR hệ thống tự động	213
60. <i>Clostridium</i> nuôi cấy, định danh	216
61. <i>Clostridium difficile</i> miễn dịch bán tự động	219
62. <i>Clostridium difficile</i> PCR	222
63. <i>Leptospira</i> test nhanh	225
64. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Real-time PCR	227
65. <i>Mycoplasma hominis</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc	231

66. <i>Rickettsia</i> Ab miễn dịch bán tự động	234
67. <i>Salmonella</i> Widal	237
68. <i>Streptococcus pyogenes</i> ASO	240
69. <i>Treponema pallidum</i> soi tươi	243
70. <i>Treponema pallidum</i> nhuộm soi	245
71. <i>Treponema pallidum</i> RPR định tính và định lượng	248
72. <i>Treponema pallidum</i> TPHA định tính và định lượng	251
73. <i>Ureaplasma urealyticum</i> nuôi cấy, định danh và kháng thuốc	255

XÉT NGHIỆM VIRUS

74. Virus test nhanh.....	258
75. Virus Ag miễn dịch tự động.....	260
76. Virus Ab miễn dịch tự động.....	264
77. HBsAg test nhanh	268
78. HBsAg miễn dịch bán tự động.....	271
79. HBsAg miễn dịch tự động.....	275
80. HBsAg khẳng định.....	279
81. HBsAg định lượng	283
82. HBsAb miễn dịch bán tự động.....	287
83. HBsAb định lượng	291
84. HBc IgM miễn dịch bán tự động	295
85. HBc IgM miễn dịch tự động	299
86. HBc total miễn dịch bán tự động	303
87. HBc total miễn dịch tự động	307
88. HBeAg miễn dịch bán tự động	311
89. HBeAg miễn dịch tự động	315
90. HBeAb miễn dịch bán tự động	318
91. HBeAb miễn dịch tự động	322
92. HBV đo tải lượng Real-time PCR	325
93. HBV đo tải lượng hệ thống tự động.....	329
94. HBV genotype PCR	333
95. HBV genotype Real-time PCR	336
96. HBV genotype giải trình tự gene	340
97. HBV kháng thuốc Real-time PCR (Cho 1 loại thuốc).....	343

98. HBV kháng thuốc giải trình tự gene.....	346
99. HCV Ab miễn dịch bán tự động	349
100. HCV Ab miễn dịch tự động.....	353
101. HCV Ag/Ab miễn dịch bán tự động	357
102. HCV Core Ag miễn dịch tự động	361
103. HCV PCR.....	365
104. HCV đo tải lượng Real-time PCR	368
105. HCV đo tải lượng hệ thống tự động	372
106. HCV genotype Real-time PCR.....	375
107. HCV genotype giải trình tự gene.....	379
108. HAV IgM miễn dịch bán tự động.....	382
109. HAV IgM miễn dịch tự động.....	386
110. HAV total miễn dịch bán tự động.....	390
111. HAV total miễn dịch tự động	394
112. HDV Ag miễn dịch bán tự động.....	398
113. HDV IgM miễn dịch bán tự động.....	402
114. HDV Ab miễn dịch bán tự động.....	406
115. HEV IgM test nhanh.....	409
116. HEV IgM miễn dịch bán tự động	412
117. HIV Ab test nhanh	415
118. HIV Ag/Ab test nhanh	418
120. HIV Ag/Ab miễn dịch bán tự động	425
121. HIV Ag/Ab miễn dịch tự động	429
122. HIV khẳng định	433
123. HIV đo tải lượng Real-time PCR.....	437
124. HIV đo tải lượng hệ thống tự động.....	440
125. HIV genotype giải trình tự gene	444
128. Dengue virus NS1Ag/IgM/IgG test nhanh	453
129. Dengue virus IgM/IgG test nhanh	456
130. Dengue virus IgM miễn dịch bán tự động.....	459
131. Dengue virus IgG miễn dịch bán tự động.....	463
132. Dengue virus PCR	467
133. Dengue virus serotype PCR.....	470

134. CMV IgM miễn dịch bán tự động.....	473
135. CMV IgM miễn dịch tự động	477
136. CMV IgG miễn dịch bán tự động	481
137. CMV IgG miễn dịch tự động	485
138. CMV PCR	489
139. CMV Real-time PCR	492
140. CMV đo tải lượng hệ thống tự động	495
141. CMV Avidity	498
142. HSV 1 + 2 IgM miễn dịch bán tự động	502
143. HSV 1+ 2 IgG miễn dịch bán tự động	506
144. HSV Real-time PCR	510
145. VZV Real-time PCR	514
146. EBV-VCA IgM miễn dịch bán tự động	518
147. EBV-VCA IgG miễn dịch bán tự động.....	522
148. EBV EA-D IgG miễn dịch bán tự động.....	526
149. EBV EB-NA IgG miễn dịch bán tự động	530
150. EBV PCR	534
151. EBV Real-time PCR	537
152. EV71 PCR.....	541
155. Enterovirus PCR.....	551
156. Entrovirus genotype giải trình tự gene.....	554
157. Adenovirus Real-time PCR.....	557
158. BK/JC virus PCR	561
159. HPV PCR	565
160. HPV Real-time PCR	568
161. HPV Genotype Real-time PCR.....	572
162. HPV genotype PCR hệ thống tự động	575
163. HPV genotype giải trình tự gene.....	579
164. Influenza virus A, B test nhanh.....	582
165. Influenza virus A, B Real-time PCR.....	584
166. Influenza virus A, B giải trình tự gene	587
167. JEV IgM miễn dịch bán tự động.....	590
168. Measle virus Ab miễn dịch bán tự động	593

169. Rotavirus test nhanh.....	596
170. RSV Ab miễn dịch bán tự động.....	599
171. RSV Real-time PCR	602
172. Rubella virus IgM miễn dịch bán tự động	605
173. Rubella virus IgM miễn dịch tự động.....	609
174. Rubella virus IgG miễn dịch bán tự động.....	613
175. Rubella virus IgG miễn dịch tự động	617
176. Rubella virus PCR	621
177. Rubella virus giải trình tự gene.....	624

XÉT NGHIỆM KÝ SINH TRÙNG - VI NẤM

178. Hồng cầu, bạch cầu trong phân soi tươi	627
179. Hồng cầu trong phân test nhanh	630
180. Đơn bào đường ruột soi tươi.....	633
181. Đơn bào đường ruột nhuộm soi	636
182. Trứng giun, sán soi tươi.....	639
183. Trứng giun soi tập trung	642
184. <i>Strongyloides stercoralis</i> (Giun lươn) ấu trùng soi tươi.....	645
185. <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Giun tròn chuột) Ab miễn dịch bán tự động.....	648
186. <i>Clonorchis/Opisthorchis</i> (Sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch bán tự động.....	651
187. <i>Cysticercus cellulosae</i> (Sán lợn) Ab miễn dịch bán tự động.....	654
188. <i>Entamoeba histolytica</i> (Amip) Ab miễn dịch bán tự động.....	657
189. <i>Fasciola</i> (Sán lá gan lớn) Ab miễn dịch bán tự động.....	660
190. <i>Filaria</i> (Giun chỉ) ấu trùng trong máu nhuộm soi	663
191. <i>Gnathostoma</i> (<i>Giun đầu gai</i>) Ab Miễn dịch bán tự động.....	666
192. <i>Plasmodium</i> (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định tính	669
193. <i>Plasmodium</i> (Ký sinh trùng sốt rét) nhuộm soi định lượng	672
194. <i>Plasmodium</i> (Ký sinh trùng sốt rét) Ag test nhanh	675
195. <i>Strongyloides stercoralis</i> (Giun lươn) Ab miễn dịch bán tự động	677
196. <i>Toxocara</i> (Giun đũa chó mèo) Ab miễn dịch bán tự động.....	680
197. <i>Toxoplasma</i> IgM miễn dịch tự động.....	683
198. <i>Toxoplasma</i> IgG miễn dịch tự động	687
199. <i>Toxoplasma</i> Avidity miễn dịch tự động	691

200. <i>Demodex</i> soi tươi	695
201. <i>Demodex</i> nhuộm soi	698
202. <i>Phthirus pubis</i> (Rận mu) soi tươi.....	701
203. <i>Phthirus pubis</i> (Rận mu) nhuộm soi	703
204. <i>Sarcoptes scabies hominis</i> (Ghẻ) soi tươi.....	706
205. <i>Sarcoptes scabies hominis</i> (Ghẻ) nhuộm soi	709
206. <i>Cysticercus cellulosae</i> (Sán lợn) ấu trùng soi mảnh sinh thiết	712
207. <i>Gnathostoma</i> ấu trùng soi mảnh sinh thiết	715
208. <i>Taenia</i> (Sán dây) soi tươi định danh.....	718
209. <i>Toxocara</i> (Giun đũa chó, mèo) soi mảnh sinh thiết.....	721
210. <i>Trichinella spiralis</i> (Giun xoắn) soi mảnh sinh thiết.....	724
211. <i>Trichomonas vaginalis</i> soi tươi.....	727
212. <i>Trichomonas vaginalis</i> nhuộm soi	730
213. <i>Pneumocystis jirovecii</i> nhuộm soi.....	733
214. Vi nấm soi tươi.....	736
215. Vi nấm test nhanh.....	739
216. Vi nấm nhuộm soi	742
217. Vi nấm nuôi cấy và định danh bằng phương pháp thông thường.....	745
218. Vi nấm nuôi cấy và định danh hệ thống tự động	748
219. Vi nấm nuôi cấy, định danh và kháng thuốc hệ thống tự động	751
220. Vi nấm kháng định (tham chiếu).....	754
221. Vi nấm kháng thuốc định lượng (MIC) (Cho 1 loại kháng sinh)	757
222. Vi nấm PCR	760
223. Vi nấm giải trình tự gene	763
XÉT NGHIỆM ĐÁNH GIÁ NHIỄM KHUẨN BỆNH VIỆN	
224. Vi sinh vật cấy kiểm tra không khí	766
225. Vi sinh vật cấy kiểm tra bàn tay.....	770
226. Vi sinh vật cấy kiểm tra dụng cụ đã tiệt trùng	773
227. Vi sinh vật cấy kiểm tra bề mặt.....	776
228. Vi sinh vật cấy kiểm tra nước sinh hoạt.....	779
229. Vi sinh vật cấy kiểm tra nước thải	783
230. Vi khuẩn kháng thuốc - Phát hiện người mang	787
231. Vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện - Phát hiện nguồn nhiễm	841

CÁC TỪ VIẾT TẮT

BCĐN:	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 nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Máy ly tâm (cần cho một số loại bệnh phẩm)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- 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	Số lượng
1	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	1,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm đỏ fuchsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 95%	ml	10,000

10	Lugol	ml	5,000
11	Thuốc nhuộm xanh methylen	ml	5,000
12	Bông	Kg	0,001
13	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
14	Đèn cồn	Cái	0,0001
15	Panh	Cái	0,0001
16	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
17	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
18	Mũ	Cái	0,020
19	Khẩu trang	Cái	0,020
20	Găng tay	Đôi	3,000
21	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
22	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
23	Acid ngậm lam	ml	10,000
24	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
25	Bút viết kính	Cái	0,020
26	Bút bi	Cái	0,010
27	Bật lửa	Cái	0,010
28	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
29	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
30	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
31	Khăn lau tay	Cái	0,030
32	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
33	QC (nếu thực hiện) *		0,1
34	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Các loại bệnh phẩm được chỉ định xét nghiệm vi khuẩn.

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.

- Nhỏ dung dịch tím gentian, phủ kín nơi dàn đồ phiên, duy trì 1 - 2 phút
- Đổ dung dịch tím gentian, rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy nhẹ
- Nhỏ dung dịch lugol, để 30 giây
- Đổ dung dịch lugol, rửa nước
- Tẩy màu: nhỏ vài giọt cồn 95% lên tiêu bản, nghiêng đi nghiêng lại để cho cồn chảy từ cạnh nọ sang cạnh kia. Khi thấy màu tím trên lam kính vừa phai hết thì rửa nước ngay.
- Nhỏ dung dịch đỏ fuchsin, để 1 - 2 phút
- Rửa nước kỹ, để khô tiêu bản, soi kính hiển vi.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt tiêu chuẩn.

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

- Soi dưới vật kính dầu (x100)
- Diễn giải và đọc kết quả:

Vi khuẩn Gram (+) bắt màu tím sẫm của gentian.

Vi khuẩn Gram (-) bắt màu đỏ của fuchsin.

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Gram dương giả: Tẩy còn chưa đủ thời gian

Gram âm giả:

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

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

2. Vi khuẩn test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

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	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Đầu côn 200 ul	Cái	2,000
11	Giấy thấm	Cuộn	0,100
12	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
13	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001

14	Bút viết kính	Cái	0,020
15	Bút bi	Cái	0,010
16	Mũ	Cái	0,020
17	Khẩu trang	Cái	0,020
18	Găng tay	Đôi	0,100
19	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
20	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
21	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
22	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
23	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
24	Khăn lau tay	Cái	0,010
25	QC (nếu thực hiện) *		0,1
26	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

Thực hiện xét nghiệm 05 mẫu bệnh phẩm/lần.

* 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

Các loại bệnh phẩm chỉ định làm test nhanh.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC THỰC HIỆN

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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Slidex Meningite – Kit 5 (VD) phát hiện 5 căn nguyên vi khuẩn gây viêm màng não.

Các bước thực hiện	Kỹ thuật
1.	Đưa sinh phẩm ra ngoài nhiệt độ phòng Đánh số thứ tự các bệnh phẩm và số thứ tự trên tấm kính
2.	Lắc nhẹ nhàng lọ chứa hạt latex, không được lắc quá mạnh
3.	Dùng pipet nhỏ 1 giọt dịch não tủy của người bệnh vào ô tương ứng đã đánh số trên phiến kính. Nhỏ chứng dương và chứng âm
4.	Lắc nhẹ nhàng lọ có chứa hạt latex và nhỏ một giọt vào cạnh giọt dịch não tủy của người bệnh
5.	Trộn đều 2 loại với nhau bằng que trộn phủ đều bề mặt của mỗi ô.
6.	Lắc đều cả phiến kính bằng tay hoặc dùng máy lắc 80-100 vòng trong 10 phút
7.	Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Ô chứng dương: có hiện tượng ngưng kết hạt latex
- Ô chứng âm: không có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy mịn, đồng nhất
- Ô không có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy mịn, đồng nhất: Âm tính
- Ô có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy thô, có hạt ngưng kết rõ trên nền đen.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Lượng bệnh phẩm đưa vào quá nhiều hoặc quá ít đều có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Do vậy, phải tiến hành lấy thể tích bệnh phẩm đúng theo yêu cầu (Xem Phụ lục 6).

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

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

3. 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 2
- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Máy tính cài phần mềm đọc API (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	Số lượng
1	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	1,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000

7	Thuốc nhuộm đỏ fuchsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 95 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Thuốc nhuộm xanh methylen	ml	5,000
12	Môi trường nuôi cấy	Đĩa	1,500
13	Bộ sinh vật hóa học (bộ API ...)	Test	0,500
14	Bông	Kg	0,001
15	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
16	Đèn cồn	Cái	0,0001
17	Panh	Cái	0,0001
18	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
19	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
20	Mũ	Cái	0,020
21	Khẩu trang	Cái	0,020
22	Găng tay	Đôi	3,000
23	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
24	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
25	Acid ngậm lam	ml	10,000
26	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Bật lửa	Cái	0,010
30	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
31	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
32	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
33	Khăn lau tay	Cái	0,030
34	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
35	QC (nếu thực hiện) *		0,1
36	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

Môi trường nuôi cấy và hóa chất định danh vi khuẩn được tính trên tỉ lệ dương tính trung bình là 50 % cho các loại bệnh phẩm.

* 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

Tất cả các loại bệnh phẩm được chỉ định nuôi cấy tìm vi khuẩn 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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Nhuộm soi bệnh phẩm, đánh giá sơ bộ
- Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập
- Ủ ấm qua đêm
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ
- Nhuộm soi, thử nghiệm các thử nghiệm sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng các bộ sinh vật hóa học (bộ API ...)

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện để nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.

Nếu có yêu cầu tìm căn nguyên vi khuẩn hiếm gặp, phải ghi yêu cầu cụ thể.

Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng yêu cầu có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả (Xem Phụ lục 6).

4. Vi khuẩn nuôi cấy, định danh hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện vi khuẩn gây bệnh bằng phương pháp nuôi cấy, định danh trên hệ thống tự động.

2. Nguyên lý

Vi khuẩn được định danh bằng máy tự động dựa trên một số tính chất chuyển hóa kết hợp với các đặc điểm về hình thái học và tính chất bắt màu.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO₂
- Hệ thống định danh tự động
- Máy đo độ đục
- Lò hấp ưót
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000

7	Thuốc nhuộm đỏ fuchsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 95 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Thuốc nhuộm xanh methylen	ml	5,000
12	Môi trường nuôi cấy	Đĩa	1,500
13	Panel định danh theo hệ thống máy tự động	Test	0,500
14	Bộ Panel chứng	Bộ	0,0002
15	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
16	Bông	Kg	0,001
17	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
18	Đèn cồn	Cái	0,0001
19	Panh	Cái	0,0001
20	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
21	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	3,000
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
27	Acid ngậm lam	ml	10,000
28	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
29	Bút viết kính	Cái	0,020
30	Bút bi	Cái	0,010
31	Bật lửa	Cái	0,010
32	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
33	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Khăn lau tay	Cái	0,030
36	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
37	QC (nếu thực hiện) *		0,1
38	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

Môi trường nuôi cấy được tính trên tỉ lệ dương là 50 % so với tổng số bệnh phẩm gửi xét nghiệm.

Bộ Panel sử dụng để kiểm chuẩn được tính trên 5000 Test/1 năm.

* 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

Tất cả các loại bệnh phẩm được chỉ định nuôi cấy tìm vi khuẩn gây bệnh.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu.

II. 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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Nhuộm soi bệnh phẩm, đánh giá sơ bộ
- Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập
- Ủ ấm qua đêm
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ
- Nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng hệ thống tự động.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện để nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.

Nếu có yêu cầu tìm căn nguyên vi khuẩn nào đó, phải ghi yêu cầu cụ thể.

Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng yêu cầu có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả (Xem Phụ lục 6).

5. Vi khuẩn nuôi cấy, định danh và kháng thuốc hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện vi khuẩn gây bệnh bằng phương pháp nuôi cấy, định danh và kháng thuốc trên hệ thống tự động.

2. Nguyên lý

Vi khuẩn được định danh bằng máy tự động dựa trên một số tính chất chuyển hóa kết hợp với các đặc điểm về hình thái học và tính chất bắt màu; và xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh bằng phương pháp kháng sinh pha loãng.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO₂
- Hệ thống định danh tự động
- Máy đo độ đục
- Lò hấp ướt
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Que cấy	Cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000

5	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 95 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Thuốc nhuộm xanh methylen	ml	5,000
12	Môi trường nuôi cấy	Đĩa	1,500
13	Panel định danh theo hệ thống máy tự động	Test	1,000
14	Bộ Panel chứng	Bộ	0,0002
15	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
16	Bông	Kg	0,001
17	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
18	Đèn cồn	Cái	0,0001
19	Panh	Cái	0,0001
20	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
21	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	3,000
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
27	Acid ngậm lam	ml	10,000
28	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
29	Bút viết kính	Cái	0,020
30	Bút bi	Cái	0,010
31	Bật lửa	Cái	0,010
32	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
33	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Khăn lau tay	Cái	0,030
36	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

37	QC (nếu thực hiện) *		0,1
38	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

Môi trường nuôi cấy được tính trên tỉ lệ dương là 50 % so với tổng số bệnh phẩm gửi xét nghiệm.

Bộ Panel sử dụng để kiểm chuẩn được tính trên 5000 Test/1 năm.

* 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

Tất cả các loại bệnh phẩm được chỉ định nuôi cấy tìm vi khuẩn 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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Nhuộm soi bệnh phẩm, đánh giá sơ bộ
- Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập
- Ủ ấm qua đêm
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ
- Nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng hệ thống tự động.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện để nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả âm tính không có

nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.

Sử dụng sai panel định danh cho loại vi khuẩn cần xác định. Cần chọn lựa chính xác panel định danh cho từng loại vi khuẩn.

Nếu có yêu cầu tìm căn nguyên vi khuẩn nào đó, phải ghi yêu cầu cụ thể.

Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng yêu cầu có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả (Xem Phụ lục 6).

6. Vi khuẩn kháng thuốc định tính

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn thử nghiệm được đánh giá bằng phương pháp kháng sinh khuếch tán trong thạch. Sự phát triển của vi khuẩn sẽ bị ức chế khi kháng sinh đạt đến một nồng độ nhất định. Đường kính vùng ức chế tỷ lệ thuận với mức độ nhạy cảm được phiên giải ra các phân loại **S** (sensitive – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng) khi so sánh với bảng chuẩn CSLI cập nhật hàng năm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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 ấm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy lắc
- Ống độ đục chuẩn McFarland 0.5

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	Khoanh giấy kháng sinh	Khoanh	22,000
2	Que cấy	Cái	1,000
3	Thạch Muller Hinton	Đĩa	3,000
4	Thạch máu	Đĩa	1,000
5	Giấy kháng sinh đồ	Tờ	2,000
6	Bông	Kg	0,001
7	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000

8	Panh	Cái	0,0001
9	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
11	Mũ	Cái	0,050
12	Khẩu trang	Cái	0,050
13	Găng tay	Đôi	3,000
14	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,030
15	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
16	Nước muối sinh lý	ml	5,000
17	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
18	Tăm bông vô trùng	Cái	1,000
19	Bút viết kính	Cái	0,020
20	Bút bi	Cái	0,010
21	Bật lửa	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,050
26	QC (nếu thực hiện) *		0,1
27	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Chủng vi khuẩn được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần và mới.

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

Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 16-24 giờ).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Pha huyền dịch vi khuẩn

Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ 3-5 khuẩn lạc có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống nước muối sinh lý 5 ml, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất. So sánh độ đục của huyền dịch vi khuẩn với độ đục của ống McFarland 0,5.

2.2. Dàn đều canh khuẩn lên mặt đĩa thạch

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

2.3. Đặt các khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch

Các khoanh giấy sau khi đặt cần được ấn xuống vừa phải để đảm bảo chúng được tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Trong vòng 15 phút sau khi đặt khoanh giấy kháng sinh, các đĩa thạch phải được lật úp để trong tủ ấm 35°C.

2.4. Ủ đĩa thạch trong tủ ấm 16 - 24 giờ

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

Đo đường kính vùng ức chế (bao gồm cả đường kính của khoanh giấy kháng sinh) tính theo mm.

Phiên giải đường kính vùng ức chế ra kết quả S, I, R theo hướng dẫn của CLSI cập nhật hàng năm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng cho các chủng vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.

Sai sót có thể gặp khi:

- Lẫn hai hay nhiều chủng vi khuẩn
- Vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.

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

7. Vi khuẩn kháng thuốc hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn thử nghiệm được đánh giá dựa trên giá trị của nồng độ ức chế tối thiểu - MIC. Giá trị MIC sẽ được phiên giải ra phân loại **S** (sensitive – nhạy cảm), **I** (intermediate – trung gian), hoặc **R** (resistant – đề kháng) nhờ hệ thống tự động.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Máy định danh, kháng sinh đồ tự động (ví dụ Hệ thống Vitek 2 Compact)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vi tính
- Máy in

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	Thẻ kháng sinh đồ	Thẻ	1,000
2	Que cấy	Cái	1,000
3	Blood agar base 500G	ml	75,000
4	Dụng cụ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
5	Mac Conkey agar	ml	75,000
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Mũ	Cái	0,030
8	Khẩu trang	Cái	0,030

9	Găng tay	Đôi	3,000
10	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,030
11	Quần áo bảo hộ	Cái	0.0005
12	ống nghiệm thủy tinh	ống	1,000
13	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
14	Khăn lau tay	Cái	0,030
15	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	4,000
16	Presept	Viên	1,000
17	QC (nếu thực hiện) *		0,1
18	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Chủng vi khuẩn được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần và mới.

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

Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 16-24 giờ).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị mẫu
- Nạp ống nghiệm và card test đúng loại vào cassette
- Nhập mẫu vào máy
- Khai báo thông tin
- Tạo thông tin bệnh nhân
- Xem kết quả của mẫu

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

Ghi nhận các kết quả S, I hay R cùng với giá trị MIC.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng cho các chủng vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.

Sai sót có thể gặp khi:

- Lẫn hai hay nhiều chủng vi khuẩn
 - Chọn thẻ làm kháng sinh đồ không phù hợp với chủng vi khuẩn cần thử nghiệm
 - Chủng vi khuẩn sau khi pha không được đưa vào máy trong vòng 30 phút
- Phải tiến hành làm lại khi thấy các hiện tượng như trên.

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

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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 ấm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy lắc
- Ống độ đục chuẩn McFarland 0.5

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	Thanh giấy kháng sinh	Cái	1,000
2	Que cấy	Cái	1,000
3	Thạch Muller Hinton	Đĩa	1,000
4	Thạch máu	Đĩa	1,000

5	Giấy kháng sinh đồ	Tờ	2,000
6	Bông	Kg	0,001
7	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
8	Panh	Cái	0,0001
9	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
11	Mũ	Cái	0,050
12	Khẩu trang	Cái	0,050
13	Găng tay	Đôi	3,000
14	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,030
15	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
16	Nước muối sinh lý	ml	5,000
17	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
18	Tăm bông vô trùng	Cái	1,000
19	Bút viết kính	Cái	0,020
20	Bút bi	Cái	0,010
21	Bật lửa	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,050
26	QC (nếu thực hiện) *		0,1
27	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Chủng vi khuẩn được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần và mới.

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

Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm đã được nuôi cấy thuần nhất trong điều kiện tối ưu và đang ở giai đoạn phát triển mạnh (nuôi cấy sau 16-24 giờ).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Pha huyền dịch vi khuẩn

Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ 3-5 khuẩn lạc có hình thái giống nhau nghiền đều vào ống nước muối sinh lý 5 ml, lắc đều trên máy lắc để có huyền dịch đồng nhất. So sánh độ đục của huyền dịch vi khuẩn với độ đục của ống McFarland 0,5.

2.2. Dàn đều canh khuẩn lên mặt đĩa thạch

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

2.3. Đặt các khoanh giấy kháng sinh lên mặt thạch

Đặt thanh 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. Khi đã đặt xong thanh Etest không được dịch chuyển thanh Etest khỏi vị trí.

2.4. Ủ đĩa thạch trong tủ ấm 16 - 24 giờ

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

2. Đọc kết quả

Sau ủ ấm 16 – 24 h và khi thấy rõ vi khuẩn mọc, đọc giá trị MIC ở điểm cắt của hình elip với thanh E-test. Làm tròn giá trị MIC ở điểm giữa hai bậc pha loãng lên giá trị cao hơn một bậc trước khi phiên giải kết quả.

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

Với các kháng sinh diệt khuẩn, phải đọc giá trị MIC tại điểm vi khuẩn bị ức chế hoàn toàn. Với các kháng sinh kìm khuẩn, phải đọc giá trị MIC tại điểm vi khuẩn bị ức chế 80%.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng cho các chủng vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện để nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.

Sai sót có thể gặp khi:

- Lẫn hai hay nhiều chủng vi khuẩn
- Vi khuẩn mọc quá dày hoặc quá thưa.

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

9. Vi khuẩn kháng sinh phối hợp

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Tìm cặp kháng sinh phối hợp có tác dụng hiệp đồng trên chủng vi khuẩn gây bệnh.

2. Nguyên lý

Xác định tác dụng hiệp đồng, đối kháng hoặc không khác biệt (giá trị MIC) khi thử nghiệm phối hợp 2 kháng sinh khác nhau với vi khuẩn gây bệnh bằng thanh E-test dựa trên chỉ số FIC (Fractional Inhibitory Concentration).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất

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

2.1. Trang thiết bị

- Tủ ấm
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy lắc
- Ống độ đục chuẩn McFarland 0.5

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	Thanh giấy kháng sinh	Cái	4,000
2	Thạch Muller Hinton	Đĩa	3,000
3	Que cấy	Cái	1,000
4	Thạch máu	Đĩa	2,000
5	Giấy kháng sinh đồ	Tờ	2,000
6	Bông	Kg	0,001
7	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
8	Panh	Cái	0,0001
9	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001

10	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
11	Mũ	Cái	0,050
12	Khẩu trang	Cái	0,050
13	Găng tay	Đôi	3,000
14	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,030
15	Quần áo bảo hộ bảo hộ	Bộ	0,001
16	Nước muối sinh lý	ml	5,000
17	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
18	Tăm bông vô trùng	Cái	1,000
19	Bút viết kính	Cái	0,020
20	Bút bi	Cái	0,010
21	Bật lửa	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,050
26	QC (nếu thực hiện) *		0,1
27	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Chủng vi khuẩn được xác định là căn nguyên gây bệnh, thuần và mới.

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.

- Pha huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương ứng với độ đục McFarland 0.5

- Dàn đều canh khuẩn lên mặt 2 đĩa thạch Mueller-Hinton và cấy thuần trên 1 đĩa thạch máu
- Đặt 2 thanh E-test lên 2 đĩa thạch đã dàn đều vi khuẩn
- Ủ các đĩa thạch trong tủ ấm 16 - 18 giờ
- Đọc kết quả giá trị MIC của cả hai kháng sinh
- Pha huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương ứng với độ đục McFarland 0.5 rồi dàn đều canh khuẩn lên mặt 1 đĩa thạch Mueller-Hinton và cấy thuần trên 1 đĩa thạch máu
- Đặt 2 thanh E-test vuông góc với nhau, giao nhau tại giá trị MIC của mỗi thanh đã đọc ở bước 5 lên đĩa thạch đã dàn đều vi khuẩn
- Ủ các đĩa thạch trong tủ ấm 16 - 18 giờ
- Đọc kết quả giá trị MIC của cả hai kháng sinh

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

Đọc kết quả:

- Tính chỉ số FIC (Fractional Inhibitory Concentration)

FIC của kháng sinh A = MIC của kháng sinh A trong thử nghiệm phối hợp/MIC của kháng sinh A thử nghiệm riêng

FIC của kháng sinh B = MIC của kháng sinh B trong thử nghiệm phối hợp/MIC của kháng sinh B thử nghiệm riêng

Chỉ số FIC = FIC của kháng sinh A/ FIC của kháng sinh B

- Phiên giải kết quả chỉ số FIC
 - Hai kháng sinh có tác dụng hiệp đồng nếu chỉ số FIC ≤ 0.5
 - Hai kháng sinh có tác dụng đối kháng nếu chỉ số FIC > 4
 - Hai kháng sinh phối hợp không có tác dụng khác biệt nếu chỉ số FIC ≤ 4 và > 0.5

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng cho các chủng vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện dễ nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.

Những trường hợp tác dụng đối kháng yếu có thể không phát hiện được vì vùng ức chế nằm dưới vùng bắt chéo của hai thanh E-test.

Sai sót có thể gặp khi:

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

10. Vi khuẩn kỵ khí nuôi cấy và định danh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Hệ thống máy nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Que cấy	Cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm đỏ fuchsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 95 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000

11	Thuốc nhuộm xanh methylen	ml	5,000
12	Môi trường nuôi cấy kỵ khí	chai	1,000
13	Môi trường thạch máu thường	Đĩa	2,000
14	Môi trường thạch máu kỵ khí	Đĩa	2,000
15	Bộ giá đường API	Test	1,000
16	Bình khí trộn (tính theo giờ)	Giờ	168,000
17	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
18	Bông	Kg	0,001
19	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
20	Đèn cồn	Cái	0,0001
21	Panh	Cái	0,0001
22	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
23	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
24	Mũ	Cái	0,020
25	Khẩu trang	Cái	0,020
26	Găng tay	Đôi	3,000
27	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
28	Quần áo bảo hộ bảo hộ	Bộ	0,001
29	Acid ngậm lam	ml	10,000
30	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
31	Bút viết kính	Cái	0,020
32	Bút bi	Cái	0,010
33	Bật lửa	Cái	0,010
34	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,030
38	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
39	QC (nếu thực hiện) *		0,1
39	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Tất cả các loại bệnh phẩm được chỉ định nuôi cấy tìm vi khuẩn kỵ khí 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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Nhuộm soi bệnh phẩm, đánh giá sơ bộ
- Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập
- Ủ ấm qua đêm
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ
- Nhuộm soi, thử nghiệm các thử nghiệm sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng các bộ sinh vật hóa học chuyên dụng.
- Tất cả các bước tiến hành và ủ ấm đều được thực hiện bên trong hệ thống máy nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí nhằm đảm bảo điều kiện môi trường kỵ khí.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn kỵ khí bắt buộc và kỵ khí tùy tiện. Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.

Tất cả các thao tác kỹ thuật phải diễn ra bên trong hệ thống máy tạo môi trường kỵ khí để đảm bảo điều kiện nuôi cấy thích hợp cho vi khuẩn kỵ khí mọc.

Khí trường sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn phải đảm bảo đúng nồng độ.

Nếu có yêu cầu tìm căn nguyên vi khuẩn nào đó, phải ghi yêu cầu cụ thể.

11. Vi khuẩn kháng định

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện vi khuẩn gây bệnh bằng phương pháp nuôi cấy, định danh trên hệ thống tự động.

2. Nguyên lý

Vi khuẩn được định danh bằng máy tự động dựa trên một số tính chất chuyển hóa kết hợp với các đặc điểm về hình thái học và tính chất bất màu.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO₂
- Hệ thống định danh tự động
- Máy đo độ đục
- Lò hấp ướt
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Que cấy	Cái	1,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000

7	Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 95 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Thuốc nhuộm xanh methylen	ml	5,000
12	Môi trường nuôi cấy	Đĩa	3,000
13	Panel định danh theo hệ thống máy tự động	Test	1,000
14	Bộ Panel chứng	Bộ	0,0002
15	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
16	Bông	Kg	0,001
17	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
18	Đèn cồn	Cái	0,0001
19	Panh	Cái	0,0001
20	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
21	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	3,000
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
27	Acid ngậm lam	ml	10,000
28	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
29	Bút viết kính	Cái	0,020
30	Bút bi	Cái	0,010
31	Bật lửa	Cái	0,010
32	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
33	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Khăn lau tay	Cái	0,030
36	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
37	QC (nếu thực hiện) *		0,1
37	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

Bộ Panel sử dụng để kiểm chuẩn được tính trên 5000 Test/1 năm.

* 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

Tất cả các loại bệnh phẩm được chỉ định nuôi cấy tìm vi khuẩn 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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Nhuộm soi bệnh phẩm, đánh giá sơ bộ
- Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập
- Ủ ấm qua đêm
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ
- Nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng hệ thống tự động.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện để nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.

Nếu có yêu cầu tìm căn nguyên vi khuẩn nào đó, phải ghi yêu cầu cụ thể.

Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng yêu cầu có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả (Xem Phụ lục 6).

12. Vi khuẩn định danh PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Chẩn đoán nhanh vi khuẩn trực tiếp từ bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Xác định sự có mặt của gene đặc trưng cho vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Micropipette
- Tủ âm sâu (-20°C)
- Bộ lưu điện.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000

4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1	ml	0,0001
14	Primer 2	ml	0,0001
15	Ependoff 1,7ml	Tube	3,000
16	Ependoff 0,2ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay	Đôi	0,100
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch khử trùng	ml	10,000

36	Khăn lau tay	cái	0,010
37	QC (nếu thực hiện) *		0,100
38	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Vi khuẩn thuần và bệnh phẩm phân lập

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 3).

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.

13. Vi khuẩn định danh giải trình tự gene

I. NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Định danh mọi căn nguyên vi khuẩn gây bệnh đến mức độ chi và hoặc loài.

2. Nguyên lý

Định danh chính xác các loại vi khuẩn dựa trên trình tự nucleotide đặc trưng của gene mã hóa cho 16S rRNA của vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự gene.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000

3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Primer 2 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 3 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Primer 4 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
17	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
18	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
19	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
20	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
21	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
22	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
23	Ethanol BDH	ml	0,500
24	Water-DEPC Treated	ml	2,000
25	Giấy thấm	Cuộn	0,100
26	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
27	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
28	Bút viết kính	Cái	0,020
29	Bút bi	Cái	0,010
30	Mũ	Cái	0,020
31	Khẩu trang	Cái	0,020
32	Găng tay	Đôi	0,100
33	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
34	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005

35	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
36	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
37	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
38	Khăn lau tay	cái	0,010
39	QC (nếu thực hiện) *		0,100
40	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Chủng vi khuẩn nuôi cấy thuần.

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 3).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Tách chiết DNA tổng số
- Thực hiện PCR gene 16S ARN ribosome
- Điện di kiểm tra sản phẩm
- Giải trình tự gene
- Kiểm tra độ tương đồng DNA

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 mã hóa cho 16S rRNA có trên “Genebank” để định danh căn nguyên vi khuẩn cần xác định. Trình tự nucleotide phải có độ tương đồng $\geq 97\%$ mới có thể kết luận được đến mức độ chi và/hoặc loài.

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.

14. Vi khuẩn kháng thuốc PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện đặc tính kháng thuốc của vi khuẩn thông qua xác định sự có mặt của gene kháng thuốc ở vi khuẩn.

2. Nguyên lý

Sử dụng cặp mồi có trình tự đặc hiệu để xác định sự có mặt của gene kháng thuốc trong vi khuẩn gây bệnh bằng kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Micropipette
- Bộ lưu điện.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001

6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1	ml	0,0001
14	Primer 2	ml	0,0001
15	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
16	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay	Đôi	0,100
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
36	Khăn lau tay	cái	0,010
37	QC (nếu thực hiện) *		0,100

38	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 hoặc chủng vi khuẩn cần xác định đặc tính kháng thuốc.

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 3).

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.

15. Vi khuẩn kháng thuốc giải trình tự gene

I. NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gene kháng thuốc có trong vi khuẩn gây bệnh.

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: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001

5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Primer 2 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 3 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Primer 4 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
17	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
18	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
19	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
20	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
21	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
22	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
23	Ethanol BDH	ml	0,500
24	Water-DEPC Treated	ml	2,000
25	Giấy thấm	Cuộn	0,100
26	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
27	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
28	Bút viết kính	Cái	0,020
29	Bút bi	Cái	0,010
30	Mũ	Cái	0,020
31	Khẩu trang	Cái	0,020
32	Găng tay	Đôi	0,100
33	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
34	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
35	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
36	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000

37	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
38	Khăn lau tay	cái	0,010
39	QC (nếu thực hiện) *		0,100
40	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 hoặc chủng vi khuẩn cần tìm gene kháng thuốc.

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 3).

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 của các đột biến kháng thuốc.

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.

16. Vi hệ đường ruột

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Đánh giá tỷ lệ các loại vi khuẩn có mặt trong phân.

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- 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	Số lượng
1	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Que cấy	Cái	1,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm đỏ fuchsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 95 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Thuốc nhuộm xanh methylen	ml	5,000

12	Bông	Kg	0,001
13	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
14	Đèn cồn	Cái	0,0001
15	Panh	Cái	0,0001
16	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
17	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
18	Mũ	Cái	0,020
19	Khẩu trang	Cái	0,020
20	Găng tay	Đôi	3,000
21	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
22	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
23	Acid ngậm lam	ml	10,000
24	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
25	Bút viết kính	Cái	0,020
26	Bút bi	Cái	0,010
27	Bật lửa	Cái	0,010
28	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
29	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
30	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
31	Khăn lau tay	Cái	0,030
32	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
33	QC (nếu thực hiện) *		0,1
33	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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: 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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị 2 tiêu bản

2.2. Nhuộm đơn bằng xanh methylene 1 tiêu bản

2.3. Nhuộm Gram 1 tiêu bản

- Nhỏ dung dịch tím gentian, phủ kín nơi dàn đồ phiến, duy trì 1 - 2 phút
- Đổ dung dịch tím gentian, rửa tiêu bản d-ới vòi n-ớc chảy nhẹ
- Nhỏ dung dịch lugol, để 30 giây
- Đổ dung dịch lugol, rửa n-ớc
- Tẩy màu: nhỏ vài giọt cồn 95% lên tiêu bản, nghiêng đi nghiêng lại để cho cồn chảy từ cạnh nọ sang cạnh kia. Khi thấy màu tím trên lam kính vừa phai hết thì rửa n-ớc ngay.
- Nhỏ dung dịch đỏ fuchsin, để 1 - 2 phút
- Rửa n-ớc kỹ, để khô tiêu bản, soi kính hiển vi.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Đánh giá hình ảnh tế bào trên tiêu bản nhuộm đơn.

Đánh giá hình ảnh vi khuẩn trên tiêu bản nhuộm Gram

- Soi dưới vật kính dầu (100x)

- Diễn giải và đọc kết quả:

Vi khuẩn Gram (+) bắt màu tím sẫm gentian.

Vi khuẩn Gram (-) bắt màu đỏ fuchsin.

Vi hệ đường ruột bình thường khi có 70% trực khuẩn Gram âm và 30% liên cầu và các trực khuẩn Gram dương khác.

Loạn khuẩn khi tỷ lệ các loại vi khuẩn trên thay đổi và/hoặc xuất hiện bào tử nấm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

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

17. AFB trực tiếp nhuộm Ziehl-Neelsen

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện các trực khuẩn bền vững với acid (AFB - acid fast bacillus) thuộc chi *Mycobacterium*.

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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 2
- Kính hiển vi quang học
- Thiết bị 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	Số lượng
1	Dung dịch fuchsin 0,3%	ml	5,000
2	Dung dịch cồn tẩy HCL 3%	ml	10,000
3	Dung dịch xanh methylen 0,3%	ml	5,000
4	Cồn 96 độ (vệ sinh dụng cụ và ngâm lam)	ml	20,000
5	Dung dịch khử khuẩn ngâm que phết đờm	ml	15,000
6	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
7	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
8	Lọ/cốc/ tuýp lấy bệnh phẩm	Lọ	1,200
9	Que cấy	Cái	1,000

10	Lam kính	Cái	1,500
11	Que phết đờm	Cái	1,500
12	Dầu soi kính	ml	1,000
13	Giấy lau kính	Tờ	2,000
14	Bông	Kg	0,001
15	Đèn cồn	Cái	0,0001
16	Panh	Cái	0,0001
17	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
18	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
19	Hộp lưu tiêu bản	Cái	0,0001
20	Bô can (bình chứa) vật nhiễm	Cái	0,0001
21	Mũ	Cái	0,020
22	Khẩu trang	Cái	0,020
23	Găng tay	Đôi	2,000
24	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
25	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
26	Khăn lau tay	Cái	0,030
27	Túi chứa rác thải lây nhiễm	Cái	0,0001
28	Khăn giấy vệ sinh các bàn làm việc	Tờ	2,000
29	Bút viết kính	Cái	0,020
30	Bút bi	Cái	0,010
31	Bật lửa	Cái	0,010
32	Sổ nhận bệnh phẩm	Tờ	0,001
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
34	Sổ bàn giao kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
35	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
36	Nhãn mã vạch	Cái	3,000
37	QC (nếu thực hiện) *		0,1
38	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Đờm, dịch phế quản, phân, mủ, dịch não tủy, các loại dịch khác, ...

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

- Chuẩn bị tiêu bản đạt tiêu chuẩn của CTCLQG
- Cố định tiêu bản
- Nhỏ dung dịch fuchsin phủ kín nơi dàn đồ phiến, hơi nóng cho bốc hơi 3 lần (không được sôi)
- Rửa nước
- Tẩy màu bằng dung dịch cồn acid cho đến khi phai hết màu đỏ
- Rửa nước
- Nhỏ dung dịch xanh methylen phủ lên vùng dàn tiêu bản
- Đọc và đánh giá kết quả tiêu bản trên kính hiển vi quang học

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

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

Có từ 1-9 AFB/ 100 vi trường	Dương tính	Ghi số lượng cụ thể
Không AFB/ 100 vi trường	Âm tính	

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Mỗi mẻ nhuộm không nên quá 12 tiêu bản, các tiêu bản để cách nhau ít nhất 1 cm.
- Tiêu bản vẫn còn màu hồng do tẩy chưa đủ thời gian.
- Tiêu bản có nhiều cạnh fuchsin do chưa lọc hóa chất hoặc chai nhuộm không được súc rửa khi cho hóa chất mới.
- Tiêu bản nhìn không rõ vi trường có thể do để ngược tiêu bản, điều chỉnh kính hiển vi chưa đúng...
- AFB nhạt màu có thể do tẩy quá lâu hoặc nhuộm chưa đủ (thời gian, sức nóng).
- Nếu AFB tối màu có thể do nhuộm nền quá lâu.
- Tiêu bản có nhiều muội đen bám phía sau có thể do que đốt hết còn.

18. AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện các trực khuẩn bền vững với acid (AFB - acid fast bacillus) thuộc chi *Mycobacterium*.

2. Nguyên lý

Với kỹ thuật nhuộm huỳnh quang, AFB được phát hiện bởi hình thể trực khuẩn mảnh phát quang trên nền tối khi soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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 2
- Kính hiển vi huỳnh quang đèn LED
- Thiết bị 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	Số lượng
1	FAST Auramin O stain	ml	1,300
2	FAST Decolorizer	ml	1,200
3	Cồn 96 độ (vệ sinh dụng cụ và ngâm lam)	ml	20,000
4	Dung dịch khử khuẩn ngâm que phết đờm	ml	15,000
5	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
6	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
7	Lọ/cốc/ tuýp lấy bệnh phẩm	Lọ	1,200
8	Lam kính	Cái	1,500
9	Que phết đờm	Cái	1,500
10	Giấy lau kính	Tờ	2,000
11	Bông	Kg	0,001

12	Panh	Cái	0,0001
13	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
14	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
15	Hộp lưu tiêu bản	Cái	0,0001
16	Bô can (bình chứa) vật nhiễm	Cái	0,0001
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	2,000
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
22	Khăn lau tay	Cái	0,030
23	Túi chứa rác thải lây nhiễm	Cái	0,0001
24	Khăn giấy vệ sinh các bàn làm việc	Tờ	2,000
25	Bút viết kính	Cái	0,020
26	Bút bi	Cái	0,010
27	Sổ nhận bệnh phẩm	Tờ	0,001
28	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
29	Sổ bàn giao kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
30	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
31	Nhãn mã vạch	Cái	3,000
32	QC (nếu thực hiện) *		0,1
33	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Đờm, dịch phế quản, phân, mủ, dịch não tủy, các loại dịch khác, ...

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu 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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị tiêu bản đạt tiêu chuẩn của CTCLQG
- Cố định tiêu bản
- Nhuộm màu bằng FAST Auramin O
- Tẩy và nhuộm nền bằng FAST Decolorizer
- Đọc và đánh giá kết quả trên kính hiển vi huỳnh quang đèn LED

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Quan sát AFB bằng vật kính 40 trên kính huỳnh quang đèn LED. AFB có hình ảnh trực khuẩn mảnh, hơi cong, đứng riêng lẻ, xếp đôi, song song hoặc từng đám. AFB bắt màu vàng sáng phát quang trên nền tối. Đếm số lượng AFB và ghi kết quả như bảng sau:

Số lượng AFB	Kết quả	Mức độ
>50AFB/1 vi trường (Đọc ít nhất 8 vi trường)	Dương tính	3 +
5-50AFB/1 vi trường (Đọc ít nhất 20 vi trường)	Dương tính	2+
20-199AFB/1 dòng (Đọc ít nhất 1 dòng)	Dương tính	1 +
1-19AFB /1 dòng	Dương tính	Ghi số lượng cụ thể
0 AFB /ít nhất 1 dòng	Âm tính	

Lưu ý: 1 dòng lam tương đương 40 vi trường.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Mỗi mẻ nhuộm không nên quá 12 tiêu bản, các tiêu bản để cách nhau ít nhất 1 cm.
- AFB phát quang yếu có thể do tiêu bản sau khi nhuộm không đọc ngay, tiêu bản bị tiếp xúc nhiều với ánh sáng.
- AFB phát quang yếu có thể do chất lượng hóa chất không đạt do bảo quản chưa đúng, quá hạn.

19. *Mycobacterium tuberculosis* nuôi cấy môi trường lỏng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện *Mycobacterium tuberculosis* bằng kỹ thuật nuôi cấy môi trường lỏng.

2. Nguyên lý

Tube MGIT chứa môi trường lỏng Middlebrook 7H9 có oxy hòa tan và 1 hợp chất gồm: chất màu huỳnh quang, tris 4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline ruthenium chloride pentahydrate được gắn vào lớp silicone ở đáy tube. Khi vi khuẩn phát triển oxy bị tiêu thụ, nồng độ oxy giảm, chất màu huỳnh quang thoát ức chế sẽ phát quang trong tube MGIT, có thể quan sát bằng tia UV. Cường độ phát quang tương ứng với mức độ tiêu thụ oxy, tương ứng nồng độ vi khuẩn phát triển trong tube môi trường. Máy tự động giám sát sự phát quang 60 phút một lần. Vi khuẩn mọc càng nhiều càng tăng độ phát quang.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy li tâm đủ tiêu chuẩn an toàn sinh học, đủ lực ly tâm (≥ 3000 g).
- Máy lắc: vortex
- Tủ lạnh
- Cân điện tử: max 220 g, d = 0,1 mg
- Đồng hồ phút
- Kính hiển vi
- Nồi hấp
- Hệ thống máy BACTEC- MGIT 960 hoặc 320
- Pipet loại 100-1000 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	Số lượng
I	Hoá chất		
1	MGIT tuýp loại 7 ml	tuýp	1,100
2	MGIT supplement - PANTA	ml	0,900
3	KH ₂ PO ₄	gam	0,250
4	Na ₂ HPO ₄	gam	0,250
5	Cồn 70 ⁰	ml	5,000
6	Nước cất	ml	60,000
7	NaOH	gam	0,020
8	NaCitrat	gam	0,015
9	NALC	mg	25,000
10	Dầu soi	ml	0,100
11	Cồn 95 ⁰	ml	4,500
12	Cacbol fuchsin	gam	0,030
13	HCL	ml	0,300
14	Phenol	ml	0,500
15	Methylen	gam	0,030
16	Thanh định danh nhanh (SD, TBcID..)	test	0,400
17	Presept 2,5	viên	0,050
18	Microshiel	ml	1,000
19	Lòng trắng trứng	ml	0,010
II	Vật tư tiêu hao		
20	Lam kính	cái	2,200
21	Tuyp nắp xoáy vô trùng 50ml	cái	1,100
22	Pipette Paster nhựa vô trùng	cái	3,000
23	Chai thủy tinh trung tính 1000ml	cái	0,001
24	Que phết đờm	cái	0,500
25	Giấy lau kính hiển vi	tờ	0,100
26	Bông thấm nước	gam	0,500
27	Đầu côn nhựa loại 1ml	cái	0,010
28	Găng tay	đôi	0,200

29	Tuýp 18 x 24 mm	cái	0,100
30	Bô can	cái	0,010
31	Hộp đựng tiêu bản	cái	0,001
32	Túi nilon loại 2 loại chịu nhiệt hấp	cái	0,050
33	Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm	cái	0,020
34	Thùng rác có nắp	cái	0,001
35	Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm	cái	0,001
36	Hộp đựng vật sắc nhọn	cái	0,003
37	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,001
38	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	cái	0,001
39	Giá đựng tuýp	cái	0,001
40	Mũ	cái	0,020
41	Khẩu trang	cái	0,020
42	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
43	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
44	Dung dịch tẩy rửa dụng cụ	ml	10,000
45	Bút chì đen HB	cái	0,020
46	Bút bi	cái	0,010
47	Bật lửa	cái	0,010
48	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
49	Khăn lau tay	cái	0,005
50	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
51	Nhãn mã vạch	cái	4,000
52	QC (nếu thực hiện) *		0,1
53	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Đờm, dịch phế quản, phân, mủ, dịch não tủy, các loại dịch khác...

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 1 và Phụ lục 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị môi trường hóa chất

2.2. Xử lý bệnh phẩm, nhuộm soi, nuôi cấy

2.3. Định danh: soi định danh và định danh nhanh bằng sắc kí miễn dịch

2.4. Xử lý vật liệu lây nhiễm

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Kết quả nhuộm soi tìm AFB (hướng dẫn của Chương trình chống lao Quốc gia)

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

2. Kết quả cấy

- Kết quả cấy dương tính trung bình trong vòng 3 ngày đến 2 tuần: máy tự động đọc và báo kết quả dương tính bằng tín hiệu đèn đỏ và âm thanh, lấy tuýp cấy được máy báo dương ra khỏi máy để định danh.
- Kết quả cấy âm tính được máy báo bằng tín hiệu đèn xanh và âm thanh sau 6 tuần, lấy tuýp cấy được máy báo âm ra khỏi máy quan sát bằng mắt thường để phát hiện tube cấy dương (có cặn vụn) trước khi khẳng định cấy âm tránh bỏ sót các trường hợp cấy dương tính máy không phát hiện được do số lượng vi khuẩn mọc ít.
- Ngoài ra tube cấy máy báo âm tính có đầu vào nhuộm soi dương phải ly tâm lấy cặn nhuộm soi để kiểm tra kết quả.

3. Kết quả định danh

3.1. Soi định danh

Các tube cấy do máy báo dương hoặc quan sát bằng mắt thấy cặn vụn hút cặn làm tiêu bản nhuộm ZN soi định danh gặp các tình huống sau:

- AFB dạng cuộn thùng nghĩ đến *M. tuberculosis* (MTB)
- AFB hình thể vụn xếp thành đám nghĩ đến NTM
- AFB tạo dạng cuộn thùng lẫn AFB hình thể vụn: nghĩ đến mẫu cấy vừa có MTB vừa có NTM
- AFB dạng cuộn thùng lẫn vi khuẩn khác: mẫu cấy có MTB và ngoại nhiễm
- Không có AFB, có các vi khuẩn khác hoặc nấm mẫu cấy bị ngoại nhiễm
- Soi không thấy gì tiếp tục ủ ấm làm tiêu bản khác sau 3 ngày.

3.2. Định danh nhanh bằng sắc ký miễn dịch (SD, TBcID..)

Những tuýp cấy dương tiến hành soi AFB, định danh nhanh bằng sắc ký miễn dịch (SD, TBcID..) để khẳng định *M. tuberculosis* complex.

- *M. tuberculosis* complex có kết quả định danh MTB dương tính
- NTM có kết quả định danh MTB âm tính

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Máu lẫn trong bệnh phẩm ảnh hưởng đến kết quả cấy, vì vậy các bệnh phẩm lẫn nhiều máu không nuôi cấy lỏng yêu cầu lấy bệnh phẩm khác. Trường hợp dịch lẫn ít máu (túyp dịch phân thành 2 lớp: dịch trên máu dưới) gạn lấy phân dịch thêm nước cất để phá vỡ hồng cầu trước khi Xử lý.

Nhiễm chéo trong quá trình thao tác kỹ thuật: hạn chế nhiễm chéo bằng cách phân loại nguồn bệnh phẩm dịch, đờm, nghi MDR, người bệnh thường...để Xử lý thích hợp. Không cấy chuyển chủng không làm tiêu bản soi định danh cùng lúc Xử lý bệnh phẩm. Chia nhỏ hóa chất dung dịch đậm, thao tác nhẹ nhàng tránh tạo hạt mù, chất dung dịch vào thành tuýp. Không mở đồng thời các tuýp mẫu Mỗi mẻ Xử lý 6 - 8 mẫu.

Tỷ lệ ngoại nhiễm cao: giảm ngoại nhiễm bằng cách: Xử lý mẫu càng sớm càng tốt. Mẫu bảo quản 2 – 8 °C không quá 72 giờ, dịch dạ dày, nước tiểu Xử lý sớm trước 4 giờ kể từ khi lấy mẫu. Tuân thủ quy trình xử lý, nồng độ và thời gian tiếp xúc với hóa chất. Đảm bảo chất lượng môi trường, sinh phẩm, hóa chất, dụng cụ trong hạn và vô trùng.

Nhầm lẫn hành chính: Kiểm tra cẩn thận về hành chính từ khâu nhận bệnh phẩm, vào sổ, trả kết quả, tránh nhầm lẫn. Khi thao tác kỹ thuật xếp mẫu theo thứ tự, tuân thủ quy tắc để cách ô trống đầu tiên.

20. *Mycobacterium tuberculosis* nuôi cấy môi trường đặc

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện *Mycobacterium tuberculosis* bằng kỹ thuật nuôi cấy môi trường đặc.

2. Nguyên lý

Xác định *Mycobacterium tuberculosis* có trong bệnh phẩm dựa vào hình ảnh khuẩn lạc mọc trên môi trường đặc, đặc điểm hình thể và các tính chất sinh vật hóa học của vi khuẩn nuôi cấy được.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy li tâm đủ tiêu chuẩn an toàn sinh học, đủ lực li tâm ($\geq 3000g$).
- Máy lắc
- Tủ lạnh
- Cân
- Đồng hồ phút
- Kính hiển vi
- Nồi hấp
- Tủ ấm hoặc buồng ấm (35 - 38°C)

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
I	Hoá chất		
1	KH_2PO_4	gam	0,300
2	$MgSO_4$	gam	0,0033
3	MgCitrat	gam	0,0084

4	Asparagin	gam	0,051
5	Glyxerol	ml	0,168
6	Malachite	gam	0,0026
7	Na ₂ HPO ₄	gam	0,250
8	Trứng gà	quả	1/3
9	Cồn 70 ⁰	ml	150,000
10	Nước cất	ml	65,000
11	NaOH	gam	0,020
12	NaCitrat	gam	0,015
13	NALC	mg	25,000
14	Dầu soi	ml	0,050
15	Cồn 95 ⁰	ml	4,500
16	Cacbol fuchsin	gam	0,015
17	HCL	ml	0,150
18	Phenol	ml	0,250
19	Methylen	gam	0,015
20	Thanh định danh Niacin	test	0,400
21	Presept 2,5	viên	0,050
22	Microshiel	ml	1,000
II	Vật tư tiêu hao		
23	Tuyp nắp xoáy vô trùng 50ml	cái	1,100
24	Lam kính	cái	1,200
25	Pipette Paster nhựa vô trùng	cái	2,000
26	Que phết đờm	cái	0,500
27	Giấy lau kính hiển vi	tờ	0,100
28	Gạc lọc	mét	0,030
29	Bông thấm nước	gam	0,500
30	Bông mỡ	gam	0,500
31	Pipette nhựa 10ml	cái	0,200
32	Đầu côn nhựa loại 1ml	cái	0,010
33	Găng tay	đôi	0,200
34	Tuýp thủy tinh trung tính nút xoáy	cái	0,300

35	Tuýp 18 x 24 mm	cái	0,100
36	Bô can	cái	0,010
37	Bình cầu 2000ml	cái	0,001
38	ống đong 500 ml	cái	0,001
39	ống đong 50 ml	cái	0,001
40	Phễu thủy tinh 500ml	cái	0,001
41	Cốc mỏ 500ml	cái	0,001
42	Cốc có mỏ 200 ml	cái	0,001
43	Chai thủy tinh trung tính 1000ml	cái	0,002
44	Hộp đựng tiêu bản	cái	0,001
45	Túi nilon loại 2 lớp chịu nhiệt hấp	cái	0,050
46	Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm	cái	0,020
47	Thùng rác có nắp	cái	0,001
48	Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm	cái	0,001
49	Hộp đựng vật sắc nhọn	cái	0,003
50	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,001
51	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	cái	0,001
52	Giá đựng tuýp	cái	0,001
53	Khay đựng môi trường	cái	0,001
54	Mũ	cái	0,020
55	Khẩu trang	cái	0,020
56	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
57	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
58	Dung dịch tẩy rửa dụng cụ	ml	10,000
59	Bút chì đen HB	cái	0,020
60	Bút bi	cái	0,010
61	Bật lửa	cái	0,010
62	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
63	Khăn lau tay	cái	0,005
64	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
65	Nhãn mã vạch	cái	4,000
66	QC (nếu thực hiện) *		0,1

67	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Đờm, dịch phế quản, phân, mủ, dịch não tủy, các loại dịch khác...

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 1 và Phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị môi trường hóa chất

2.2. Xử lý bệnh phẩm, nhuộm soi, nuôi cấy

Xử lý mẫu càng sớm càng tốt. Mẫu bảo quản 2 - 8⁰ C không quá 72 giờ. Dịch dạ dày, nước tiểu xử lý sớm trước 4 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.3. Định danh

2.4. Xử lý vật liệu lây nhiễm

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Kết quả nhuộm soi

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

Số lượng AFB	Kết quả	Phân loại
Có > 10 AFB/ 1 vi trường (Soi ít nhất 20 vi trường)	Dương tính	AFB 3 (+)
Có từ 1-10 AFB/ 1 vi trường	Dương tính	AFB 2 (+)

(Soi ít nhất 50 vi trường)		
Có từ 10-99 AFB/ 100 vi trường	Dương tính	AFB 1 (+)
Có từ 1-9 AFB/ 100 vi trường	Dương tính	Ghi số lượng AFB/100 vi trường
Không AFB/ 100 vi trường	Âm tính	

2. Kết quả cấy

- Kiểm tra nhiễm trùng: sau 24 - 48 giờ
- Kiểm tra sau 72 giờ: mặt môi trường khô, xoáy nắp tuýp tránh bay hơi làm khô môi trường
- Đọc kết quả cấy hàng tuần đến 8 tuần.
- Khuẩn lạc *M. tuberculosis* điển hình dạng R khô, xù xì giống súp lơ, màu trắng ngà, mọc chậm sau 7 ngày.

Quy định đánh giá kết quả

Đọc kết quả cấy	Nhận định kết quả cấy
Không thấy khuẩn lạc	Âm tính
1 – 19 khuẩn lạc	Dương tính: số khuẩn lạc
20 – 100 khuẩn lạc (mọc 1/3 bề mặt môi trường)	Dương tính: 1 +
100 – 200 khuẩn lạc (mọc ½ bề mặt môi trường)	Dương tính: 2 +
200 – 500 khuẩn lạc (mọc 2/3 bề mặt môi trường)	Dương tính: 3 +
> 500 khuẩn lạc (phủ kín toàn bộ bề mặt môi trường)	Dương tính: 4 +
Nhiễm vi khuẩn hoặc nấm	Ngoại nhiễm

3. Kết quả định danh

- *M. tuberculosis* có kết quả Niacin dương tính
- NTM (non tuberculosis mycobacteria) Niacin âm tính

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Tỷ lệ soi âm cấy dương thấp: có thể do khử tạp quá mạnh (nồng độ hóa chất, thời gian tiếp xúc) làm chết vi khuẩn lao.
- Tỷ lệ ngoại nhiễm cao: có thể tăng thể tích hoặc nồng độ hóa chất, không kéo dài thời gian khử nhiễm.
- Nhiễm chéo có thể xảy ra, đề phòng nhiễm chéo: mỗi mẻ chỉ Xử lý 6-8 bệnh phẩm không mở đồng thời các tuýp mẫu. Chia nhỏ lượng dung dịch khử nhiễm và dung dịch đệm, không chất trực tiếp dung dịch khử nhiễm hay dung dịch đệm vào bệnh phẩm.

21. *Mycobacterium tuberculosis* Mantoux

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện nhiễm *Mycobacterium tuberculosis*.

2. Nguyên lý

Phản ứng Mantoux bản chất là phản ứng quá mẫn muộn với tuberculin. Tiêm trong da 0.1 ml Tuberculin PPD (protein tinh khiết chiết tách từ vi khuẩn lao) cho người được chỉ định, nếu bị nhiễm lao sẽ có phản ứng dị ứng quá mẫn muộn (sau khi tiêm 72 giờ) tại nơi tiêm. Đọc kết quả phản ứng bằng cách xác định và đo đường kính cục sần hoặc vết phồng rộp.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

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

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

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
I	Hoá chất		
1	Tuberculin Tuỳ hãng sản xuất, có loại dung dịch, có loại đông khô và dung môi.	ml	0,150
2	Cồn 70	ml	0,300
3	Microshiel	ml	1,000
II	Vật tư tiêu hao		
4	Bơm tiêm loại 1ml	cái	1,100
5	Kim tiêm cỡ 25 - 26	cái	1,100
6	Bông thấm nước	gr	0,050
7	Hộp inox đựng bông cồn	cái	0,001
8	Khay inox	cái	0,001
9	Kéo	cái	0,001
10	Panh	cái	0,001

11	Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm	cái	0,020
12	Thùng rác có nắp	cái	0,001
13	Hộp đựng vật sắc nhọn	cái	0,003
14	Thước nhựa trong, mềm có chia vạch mm	cái	0,001
15	Mũ	cái	0,020
16	Khẩu trang	cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	0,020
18	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
19	Bút bi	cái	0,010
20	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
21	Khăn lau tay	cái	0,005
22	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Người được chỉ định xét nghiệm

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 sinh phẩm

2. Tiến hành kỹ thuật

3. Dặn dò, hẹn người bệnh đến đọc kết quả

4. Đọc kết quả

5. Xử lý vật liệu lây nhiễm

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đọc kết quả

Quan sát cục sần, hiện tượng phồng, rộp, đo đường kính cục sần, tính ra mm.

3. Diễn giải kết quả

Biện luận kết quả phụ thuộc vào loại tuberculin và hướng dẫn của nhà sản xuất. Ví dụ Tuberculin RT23 SSI chuẩn quốc tế do viện Statens Serum của Đan Mạch sản xuất: Liều tiêm 02 đơn vị (2TU/ 0,1ml = 0,04 microgam tuberculin PPD)

Đường kính cục sần		
Âm tính: 0-5mm	Dương tính: 6-14mm	Dương tính mạnh: ≥ 15 mm

Kết quả dương tính thể hiện đáp ứng miễn dịch theo một trong các tình huống sau:

- Nhiễm *Mycobacterium tuberculosis* complex.
- Nhiễm NTM.
- Tiền sử tiêm BCG (thường sau 4-8 tuần).

Phản ứng dương tính mạnh thường do nhiễm *Mycobacterium tuberculosis* complex.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Phản ứng âm tính giả: Là phản ứng âm tính trong khi người thử phản ứng có mắc bệnh lao: Thể lao tiến triển nặng (lao kê, lao màng não...) phản ứng bị ức chế hoặc

- Tiêm không đúng kỹ thuật, tuberculin bảo quản không đúng qui định về nhiệt độ và thời gian.
- Trong vòng một tháng sau khi người bệnh tiêm vắc xin có chứa virus sống (sởi, quai bị, rubella)
- Người bệnh bị các bệnh nhiễm virus (rubella, cúm,...)
- Người bệnh bị bệnh có suy giảm miễn dịch: Hodgkin, sarcoidosis, HIV
- Người bệnh rối loạn chuyển hoá nặng: Suy thận mãn, suy kiệt thiếu protein, bồng năng...
- Người bệnh già hoặc bệnh nhi dưới 6 tuần tuổi.

2. Phản ứng dương tính giả: Là phản ứng dương tính trong khi người được thử phản ứng không bị nhiễm lao (*M. tuberculosis*): Phản ứng chéo với các NTM.

3. Hiệu ứng không mong muốn

- Dị ứng có thể xảy ra với cá nhân mẫn cảm với thành phần thuốc thử. Chống chỉ định với người bệnh có tiền sử dị ứng với các thành phần thuốc thử tuberculin. Mặc dù rất hiếm, song cần phải có thuốc cấp cứu trong khi thử Mantoux
- Những cá nhân quá nhạy cảm loét, hoại tử tạo thành sẹo tại chỗ tiêm
- Có thể gặp đau đầu, sốt, nổi hạch nách.
- Có thể xảy ra sưng tấy, đau, ngứa, khó chịu ngay sau khi tiêm

22. *Mycobacterium tuberculosis* kháng thuốc hàng 1 môi trường đặc

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định mức độ đề kháng của *Mycobacterium tuberculosis* với các kháng thuốc hàng 1 trên môi trường đặc.

2. Nguyên lý

Huyền dịch *M. tuberculosis* được pha loãng bậc hai và cấy vào môi trường không thuốc và môi trường có thuốc lao theo nồng độ xác định. Tính tỉ lệ phần trăm giữa số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường có thuốc và môi trường không có thuốc. Xác định sự kháng của *M. tuberculosis* với từng loại thuốc bằng cách so tỉ lệ trên với ngưỡng kháng: Nếu trên hoặc bằng ngưỡng là vi khuẩn lao kháng thuốc; dưới ngưỡng là vi khuẩn lao nhạy cảm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy lắc
- Tủ lạnh
- Cân
- Đồng hồ phút.
- Nồi hấp
- Tủ ấm hoặc buồng ấm (35 - 38⁰C)
- Pipet tự động loại 20-100 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	Số lượng
I	Hoá chất		
1	KH ₂ PO ₄	gam	0,100

2	MgSO ₄	gam	0,010
3	MgCitrat	gam	0,025
4	Asparagin	gam	0,150
5	Glyxerol	ml	0,500
6	Malachite	gam	0,020
7	Trứng gà	quả	1,000
8	Cồn 70 ⁰	ml	70,000
9	Nước cất	ml	65,000
10	INH	g	0,0005
11	RIF	g	0,0005
12	SM	g	0,0006
13	EMB	g	0,0005
14	PNB	g	0,0025
15	Dimethylformamide	ml	0,010
16	Propylenglycol	ml	0,100
17	Presept	viên	0,050
18	Microshiel	ml	1,000
19	Mcfarland số 1	ống	0,001
20	Chủng chuẩn quốc tế H37 Rv	ống	0,001
II	Vật tư tiêu hao		
21	Tuýp nhựa vô trùng loại 15 ml	cái	2,500
22	Đầu côn nhựa loại 0,1ml	cái	2,000
23	Tuýp thủy tinh trung tính nút xoáy	cái	0,300
24	Bông thấm nước	gam	0,500
25	Bi thủy tinh 3 mm	viên	5,000
26	Bô can	cái	0,010
27	Găng tay	đôi	0,200
28	Túi nilon loại 2 lớp chịu nhiệt hấp	cái	0,050
29	Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm	cái	0,020
30	Thùng rác có nắp	cái	0,001
31	Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm	cái	0,001
32	Gạc lọc	mét	0,030

33	Bông thấm nước	gam	0,500
34	Pipette nhựa 10ml	cái	0,200
35	Đầu côn nhựa loại 1ml	cái	0,010
36	Găng tay	đôi	0,200
37	Tuýp thủy tinh trung tính nút xoáy	cái	2,000
38	Bình cầu 2000ml	cái	0,001
39	ống đong 500 ml	cái	0,001
40	ống đong 50 ml	cái	0,001
41	Phễu thủy tinh 500ml	cái	0,001
42	Cốc mỏ 500ml	cái	0,001
43	Cốc có mỏ 200 ml	cái	0,001
44	Chai thủy tinh trung tính 1000ml	cái	0,003
45	Giấy nháp	tờ	0,010
46	Giá đựng tuýp	cái	0,001
47	Khay đựng môi trường	cái	0,001
48	Mũ	cái	0,020
49	Khẩu trang N95	cái	0,020
50	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
51	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
52	Dung dịch tẩy rửa dụng cụ	ml	10,000
53	Bút bi	cái	0,010
54	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
55	Khăn lau tay	cái	0,005
56	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
57	Nhãn mã vạch	cái	10,000
58	QC (nếu thực hiện) *		0,1
59	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Chủng đã định danh vi khuẩn lao.

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 môi trường dụng cụ

2. Tiến hành kỹ thuật

3. Xử lý vật liệu lây nhiễm

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Kiểm tra ngoại nhiễm: sau 24 - 48 giờ
- Kiểm tra sau 72 giờ: mặt môi trường khô, xoáy nắp tuýp tránh bay hơi làm khô môi trường
- Theo dõi trong vòng 6 tuần
- Đọc kết quả KSD 2 lần sau 4 tuần và sau 6 tuần
- Đánh giá kết quả như kỹ thuật cấy

Đọc kết quả cấy	Nhận định kết quả cấy
Không thấy khuẩn lạc	Âm tính
1 - 19 khuẩn lạc	Dương tính: số khuẩn lạc
20 - 100 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc mọc 1/3 bề mặt môi trường)	Dương tính: 1 +
100 - 200 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc mọc 1/2 bề mặt môi trường)	Dương tính: 2 +
200 - 500 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc mọc 2/3 bề mặt môi trường)	Dương tính: 3 +
> 500 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc phủ kín toàn bộ bề mặt môi trường)	Dương tính: 4 +
Nhiễm vi khuẩn hoặc nấm	Ngoại nhiễm

So sánh kết quả vi khuẩn lao mọc giữa ống chứng và ống có thuốc, so với ngưỡng kháng < 1% là nhạy cảm, $\geq 1\%$ là kháng thuốc.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Khi làm KSD, chọn các ống môi trường đều nhau, sản xuất cùng lô cho 1 chủng

- Xếp dụng cụ, để trống vị trí đầu khi thao tác có ô trống tránh nhầm lẫn.
- Gặt chủng hạn chế lẫn môi trường
- Bảo quản chủng ở nhiệt độ $2-8^{\circ}\text{C}$ qua đêm nghiền tan dễ dàng hơn
- Lau pipet bằng bông cồn 70° sau khi cấy mỗi chủng
- Kiểm tra lượng huyền dịch đủ 0,1 ml mỗi lần hút
- Thường xuyên theo dõi ủ ấm, phát hiện loại bỏ ngoại nhiễm, làm lại kịp thời.
- Vi khuẩn mọc trên ống LJ - PNB, kiểm tra lại kết quả định danh.

Làm lại kháng sinh đồ sớm nhất có thể trong các trường hợp sau:

- Vi khuẩn không mọc trên tuýp chứng
- Số lượng khuẩn lạc trên tuýp chứng ở nồng độ $10^{-2} < 200$ khuẩn lạc (mức độ < 2+), tuýp chứng ở nồng độ 10^{-4} không mọc.
- Tỷ lệ kháng xấp xỉ ngưỡng kháng.
- Ngoại nhiễm

23. *Mycobacterium tuberculosis* kháng thuốc hàng 1 môi trường lỏng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định mức độ kháng thuốc của *M. tuberculosis* với các thuốc hàng 1 bằng kỹ thuật nuôi cấy môi trường lỏng.

2. Nguyên lý

Hệ thống Bactec MGIT 960 được dùng làm thử nghiệm kháng sinh đồ thuốc lao hàng 1. Hệ thống tự động so sánh lượng vi khuẩn mọc ở tuýp chứa thuốc với tuýp chứng không chứa thuốc, phân tích kết quả và trả lời kết quả nhạy hoặc kháng.

- Chủng vi khuẩn lao được pha theo tỷ lệ qui định, cấy vào môi trường lỏng MGIT có và không có thuốc chống lao, nhập vào máy BACTEC.
- Hệ thống máy BACTEC - MGIT giám sát liên tục sự phát quang của tuýp cấy dựa vào đơn vị sinh trưởng (GU).
- Kết quả KSD được báo cáo trong 4-13 ngày khi tuýp chứng đạt 400 GU dựa trên so sánh định lượng sự phát triển của *M. tuberculosis* trong tuýp chứng và các tuýp có thuốc:
 - + Tuýp có thuốc GU < 100 là nhạy cảm
 - + Tuýp có thuốc GU ≥ 100 là kháng thuốc

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 loại cấp 2
- Máy lắc vortex
- Tủ lạnh
- Đồng hồ phút.
- Nồi hấp
- Hệ thống máy BACTEC- MGIT 960 hoặc 320

- Pipet loại 20-100 μ l và 100-1000 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	Số lượng
I	Hoá chất		
1	MGIT tuýp loại 7 ml	tuýp	5,500
2	MGIT supplement - PANTA	ml	5,000
3	SIRE KIT (gồm 4 loại thuốc S,I,R,E tính số ml riêng mỗi loại)	ml	0,140
4	Cồn 70 ⁰	ml	5,000
5	Nước cất	ml	10,000
6	Presept 2,5	viên	0,050
7	Microshiel	ml	1,000
8	Mcfarland 1	ống	0,001
9	Mcfarland 0.5	ống	0,001
II	Vật tư tiêu hao		
10	Tuýp vô trùng 15ml	cái	2,000
11	Pipette Paster nhựa vô trùng	cái	3,000
12	Chai thủy tinh trung tính 1000ml	cái	0,001
13	Đầu côn nhựa loại 1ml	cái	2,000
14	Đầu côn nhựa loại 0,1 ml	cái	5,000
15	Găng tay	đôi	1,000
16	Bô can	cái	0,010
17	Túi nilon loại 2 lớp chịu nhiệt hấp	cái	0,050
18	Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm	cái	0,020
19	Thùng rác có nắp	cái	0,001
20	Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm	cái	0,001
21	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,001
22	Giá đựng tuýp	cái	0,001
23	Giỏ AST 5 lỗ	cái	0,001
24	Mũ	cái	0,020
25	Khẩu trang	cái	0,020
26	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020

27	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
28	Dung dịch tẩy rửa dụng cụ	ml	10,000
29	Bút bi	cái	0,010
30	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
31	Khăn lau tay	cái	0,005
32	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
33	Nhãn mã vạch	cái	5,000
34	QC (nếu thực hiện) *		0,1
35	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

- Tuýp cấy MGIT dương đã định danh là MTB
- Hoặc chủng MTB trên LJ

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 môi trường dụng cụ

2. Tiến hành kỹ thuật

3. Xử lý vật liệu lây nhiễm

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 không kết luận được (X).
- Kết quả KSD được máy báo tại thời điểm tuýp chứng (GC) đủ 400 đơn vị sinh trưởng (GU – growth unit) trong vòng 4-13 ngày. Ngưỡng kháng thuốc là 100. Kết quả nhạy khi tuýp có thuốc có GU <100, kết quả kháng khi tuýp có thuốc có GU ≥ 100 . Kết quả không kết luận được (X) có thể do:

- + GU > 400 thời gian máy báo < 4 ngày, có thể do pha huyền dịch vi khuẩn đặc hoặc chủng nhiễm trùng.
- + Một số chủng kháng thuốc đặc hiệu mọc chậm hoặc huyền dịch vi khuẩn loãng.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Máy không được bảo trì và hiệu chuẩn, phải bảo trì và hiệu chuẩn hệ thống BACTEC MGIT theo định kỳ 6 – 12 tháng, thay ống chuẩn theo lịch.
- Chất lượng môi trường MGIT, SIRE, supplement không đạt: kiểm tra chất lượng trước khi sử dụng, hủy khi sinh phẩm không đạt.
- Máy báo lỗi E 400 và E 200 phải kiểm tra toàn bộ quá trình thực hiện kỹ thuật: có thể do chủng nhiễm, vi khuẩn tạo thành cụm trong huyền dịch, pha huyền dịch đặc hoặc loãng.
- Nhầm lẫn hành chính: Kiểm tra cẩn thận về hành chính từ khâu nhận chủng, vào sổ, trả kết quả, tránh nhầm lẫn. Khi thao tác kỹ thuật xếp chủng theo thứ tự, tuân thủ qui tắc để cách ô trống đầu tiên.

24. *Mycobacterium tuberculosis* kháng thuốc hàng 2 môi trường đặc

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định mức độ kháng thuốc của *Mycobacterium tuberculosis* với các thuốc kháng lao hàng 2 bằng kỹ thuật nuôi cấy môi trường đặc.

2. Nguyên lý

Huyền dịch vi khuẩn được pha loãng bậc hai và cấy vào môi trường không thuốc và môi trường có thuốc lao theo nồng độ xác định. Tính tỉ lệ phần trăm giữa số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường có thuốc và môi trường không có thuốc. Xác định sự kháng của vi khuẩn lao với từng loại thuốc bằng cách so tỉ lệ trên với ngưỡng kháng: Nếu trên hoặc bằng ngưỡng là vi khuẩn kháng thuốc; dưới ngưỡng là vi khuẩn nhạy cảm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy lắc
- Tủ lạnh
- Cân
- Đồng hồ phút.
- Nồi hấp
- Tủ ấm hoặc buồng ấm (35 - 38⁰C)
- Pipet tự động loại 20-100 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	Số lượng
I	Hoá chất		
1	KH ₂ PO ₄	gam	0,100
2	MgSO ₄	gam	0,010

3	MgCitrat	gam	0,025
4	Asparagin	gam	0,150
5	Glyxerol	ml	0,500
6	Malachite	gam	0,020
7	Trứng gà	quả	1,000
8	Cồn 70 ⁰	ml	70,000
9	Nước cất	ml	65,000
10	OF	g	0,0005
11	AM	g	0,0005
12	KM	g	0,0006
13	CAP	g	0,0006
14	PNB	g	0,0025
15	Propylenglycol	ml	0,100
16	Presept	viên	0,050
17	Microshiel	ml	1,000
18	McFarland số 1	ống	0,001
19	Chủng chuẩn quốc tế H37 Rv	ống	0,001
II	Vật tư tiêu hao		
20	Tuýp nhựa vô trùng loại 15 ml	cỏi	2,500
21	Đầu côn nhựa loại 0,1ml	cái	2,000
22	Tuýp thủy tinh trung tính nút xoáy	cái	0,300
23	Bông thấm nước	gam	0,500
24	Bi thủy tinh 3 mm	viên	5,000
25	Bô can	cái	0,010
26	Găng tay	đôi	0,200
27	Túi nylon loại 2 lớp chịu nhiệt hấp	cái	0,050
28	Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm	cái	0,020
29	Thùng rác có nắp	cái	0,001
30	Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm	cái	0,001
31	Gạc lọc	mét	0,030
32	Bông thấm nước	gam	0,500
33	Pipette nhựa 10ml	cái	0,200

34	Đầu côn nhựa loại 1ml	cái	0,010
35	Găng tay	đôi	0,200
36	Tuýp thủy tinh trung tính nút xoáy	cái	2,000
37	Bình cầu 2000ml	cái	0,001
38	ống đong 500 ml	cái	0,001
39	ống đong 50 ml	cái	0,001
40	Phễu thủy tinh 500ml	cái	0,001
41	Cốc mỏ 500ml	cái	0,001
42	Cốc có mỏ 200 ml	cái	0,001
43	Chai thủy tinh trung tính 1000ml	cái	0,003
44	Giấy nháp	tờ	0,010
45	Giá đựng tuýp	cái	0,001
46	Khay đựng môi trường	cái	0,001
47	Mũ	cái	0,020
48	Khẩu trang N95	cái	0,020
49	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
50	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
51	Dung dịch tẩy rửa dụng cụ	ml	10,000
52	Bút bi	cái	0,010
53	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
54	Khăn lau tay	cái	0,005
55	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
56	Nhãn mã vạch	cái	10,000
57	QC (nếu thực hiện) *		0,1
58	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Chúng đã định danh vi khuẩn lao.

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 môi trường dụng cụ

2. Tiến hành kỹ thuật

3. Xử lý vật liệu lây nhiễm

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Kiểm tra ngoại nhiễm: sau 24 - 48 giờ
- Kiểm tra sau 72 giờ: mặt môi trường khô, xoáy nắp tuýp tránh bay hơi làm khô môi trường
- Theo dõi trong vòng 6 tuần
- Đọc kết quả KSD 2 lần sau 4 tuần và sau 6 tuần
- Đánh giá kết quả như kỹ thuật cấy

Đọc kết quả cấy	Nhận định kết quả cấy
Không thấy khuẩn lạc	Âm tính
1 – 19 khuẩn lạc	Dương tính: số khuẩn lạc
20 – 100 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc mọc 1/3 bề mặt môi trường)	Dương tính: 1 +
100 – 200 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc mọc 1/2 bề mặt môi trường)	Dương tính: 2 +
200 – 500 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc mọc 2/3 bề mặt môi trường)	Dương tính: 3 +
> 500 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc phủ kín toàn bộ bề mặt môi trường)	Dương tính: 4 +
Nhiễm vi khuẩn hoặc nấm	Ngoại nhiễm

So sánh kết quả vi khuẩn mọc giữa ống chứng và ống có thuốc, so với ngưỡng kháng < 1% là nhạy cảm, ≥ 1% là kháng thuốc.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Khi làm KSD, chọn các ống môi trường đều nhau, sản xuất cùng lô cho 1 chủng

- Xếp dụng cụ để trống vị trí đầu khi thao tác có ô trống tránh nhầm lẫn.

- Gặt chủng hạn chế lẫn môi trường
- Bảo quản chủng ở nhiệt độ 2- 8 0 C qua đêm nghiền tan dễ dàng hơn
- Lau pipette bằng bông cồn 70⁰ sau khi cấy mỗi chủng
- Kiểm tra lượng huyền dịch đủ 0,1 ml mỗi lần hút
- Thường xuyên theo dõi quá trình ủ ấm, phát hiện loại bỏ ngoại nhiễm, làm lại kịp thời.
- Vi khuẩn mọc trên ống LJ – PNB, kiểm tra lại kết quả định danh.

Làm lại kháng sinh đồ sớm nhất có thể trong các trường hợp sau:

- Vi khuẩn không mọc trên tuýp chứng
- Số lượng khuẩn lạc trên tuýp chứng ở nồng độ $10^{-2} < 200$ khuẩn lạc (mức độ < 2+), tuýp chứng ở nồng độ 10^{-4} không mọc.
- Tỷ lệ kháng xấp xỉ ngưỡng kháng.
- Ngoại nhiễm

25. *Mycobacterium tuberculosis* kháng thuốc hàng 2 môi trường lỏng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định mức độ đề kháng của *M. tuberculosis* với các thuốc hàng 2 bằng kỹ thuật nuôi cấy môi trường lỏng.

2. Nguyên lý

Hệ thống Bactec MGIT 960 được dùng làm thử nghiệm kháng sinh đồ thuốc lao hàng hai. Hệ thống tự động so sánh lượng vi khuẩn mọc ở tuýp chứa thuốc với tuýp chứng không chứa thuốc, phân tích kết quả và trả lời kết quả nhạy hoặc kháng.

- Chủng vi khuẩn lao được pha theo tỷ lệ qui định, cấy vào môi trường lỏng MGIT có và không có thuốc chống lao, nhập vào máy Bactec.
- Hệ thống Bactec - MGIT giám sát liên tục sự phát quang của tuýp cấy dựa vào đơn vị sinh trưởng (GU).
- Kết quả KSD được báo cáo trong 4-13 ngày khi tuýp chứng đạt 400 GU dựa trên so sánh định lượng sự phát triển của *M. tuberculosis* trong tuýp chứng và các tuýp có thuốc:
 - + Tuýp có thuốc GU < 100 là nhạy cảm
 - + Tuýp có thuốc GU ≥ 100 là kháng thuốc

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy lắc
- Tủ lạnh
- Đồng hồ phút.
- Nồi hấp
- Hệ thống máy BACTEC- MGIT 960 hoặc 320

- Pipet tự động loại 20-100 μ l và 100-1000 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	Số lượng
I	Hoá chất		
1	MGIT tuýp loại 7 ml	Tuýp	5,500
2	MGIT supplement - PANTA	Ml	5,000
3	Amikacin	G	0,0005
4	Capreomycin	G	0,0006
5	Ofloxacin	G	0,0005
6	Kanamycin	G	0,0006
7	Cồn 70 ⁰	Ml	5,000
8	Nước cất	Ml	10,000
9	Presept 2,5	Viên	0,050
10	Microshiel	Ml	1,000
11	Mcfarland 1	ống	0,001
12	Mcfarland 0.5	ống	0,001
II	Vật tư tiêu hao		
13	Tuyp vô trùng 15ml	Cái	2,000
14	Pipette Paster nhựa vô trùng	Cái	3,000
15	Chai thủy tinh trung tính 1000ml	Cái	0,001
16	Đầu côn nhựa loại 1ml	Cái	2,000
17	Đầu côn nhựa loại 0,1 ml	cỏi	5,000
18	Găng tay	Dôi	1,000
19	Bô can	cái	0,010
20	Túi nilon loại 2 lớp chịu nhiệt hấp	cái	0,050
21	Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm	cái	0,020
22	Thùng rác có nắp	cái	0,001
23	Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm	cái	0,001
24	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,001
25	Giá đựng tuýp	cái	0,001
26	Giỏ AST 5 lỗ	cái	0,001
27	Mũ	cái	0,020

28	Khẩu trang	cái	0,020
29	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
30	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
31	Dung dịch tẩy rửa dụng cụ	ml	10,000
32	Bút bi	cái	0,010
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
34	Khăn lau tay	cái	0,005
35	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
36	Nhãn mã vạch	cái	5,000
37	QC (nếu thực hiện) *		0,1
38	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Tuýp cấy MGIT dương đã định danh là MTB.

Hoặc chủng MTB trên LJ.

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 môi trường dụng cụ

2. Tiến hành kỹ thuật

3. Xử lý vật liệu lây nhiễm

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 không kết luận được (X).
- Kết quả KSD được máy báo tại thời điểm tuýp chứng (GC) đủ 400 đơn vị sinh trưởng (GU – growth unit) trong vòng 4-13 ngày. Ngưỡng kháng

thuốc là 100. Kết quả nhạy khi tuýp có thuốc có GU <100, kết quả kháng khi tuýp có thuốc có GU ≥ 100. Kết quả không kết luận được (X) có thể do:

- + GU > 400 thời gian máy báo < 4 ngày, có thể do pha huyền dịch vi khuẩn đặc hoặc chủng nhiễm trùng.
- + Một số chủng kháng thuốc đặc hiệu mọc chậm hoặc huyền dịch vi khuẩn loãng.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Bảo trì và hiệu chuẩn hệ thống BACTEC MGIT theo định kỳ
- Theo dõi và kiểm tra định kỳ chất lượng môi trường MGIT, SIRE, supplement
- Máy báo lỗi E 400 và E 200 phải kiểm tra toàn bộ quá trình thực hiện kỹ thuật: có thể do chủng nhiễm, vi khuẩn tạo thành cụm trong huyền dịch, pha huyền dịch đặc hoặc loãng.

26. *Mycobacterium tuberculosis* kháng thuốc PZA môi trường lỏng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định mức độ kháng với pyrazinamid (PZA) của *Mycobacterium tuberculosis*.

2. Nguyên lý

Hệ thống Bactec MGIT 960 được dùng làm thử nghiệm kháng sinh đồ thuốc lao pyrazinamid. Hệ thống tự động so sánh lượng vi khuẩn mọc ở tuýp chứa thuốc với tuýp chứng không chứa thuốc, phân tích kết quả và trả lời kết quả nhạy hoặc kháng.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Hệ thống Bactec MGIT 960/320
- Vortex
- Tủ lạnh
- Nồi hấp (khử nhiễm và hấp sạch)

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	Tuýp MGIT loại 7 ml	Tuýp	3,000
2	Tuýp MGIT loại 7 ml (kiểm chuẩn)	Tuýp	0,300
3	PZA Supplement	ml	2,000
4	PZA Supplement (kiểm chuẩn)	ml	0,200
5	BD BACTEC MGIT. PZA	ml	0,150
6	BD BACTEC MGIT. PZA (kiểm chuẩn)	ml	0,015

7	Colombia Blood Sheep (Thạch máu)	đĩa	1,200
8	Mc Farland 1.0	ml	0,100
9	Mc Farland 0.5	ml	0,100
10	Nước cất	ml	15,000
11	Presept	viên	0,500
12	Tuýp loại 15 ml	cái	5,000
13	Tuýp thủy tinh nắp xoáy	cái	1,000
15	Bì thủy tinh	viên	10,000
16	Pipet nhựa vô trùng	cái	3,000
17	Que cấy nhựa vô trùng	cái	1,000
18	Đầu côn loại 100 mcl	cái	5,000
19	Đầu côn loại 1ml	cái	2,000
20	Bông	Kg	0,001
21	Cồn 96 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
22	Panh	Cái	0,0001
23	Khay, giá đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
24	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
25	Chai thủy tinh 500 ml	Cái	0,0001
26	Mũ	Cái	0,020
27	Khẩu trang N95	Cái	0,050
28	Găng tay	Đôi	3,000
29	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
30	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
31	Túi chứa rác thải lây nhiễm	Cái	0,0001
32	Khăn giấy vệ sinh các bàn làm việc	Tờ	2,000
33	Bút viết kính	Cái	0,020
34	Bút bi	Cái	0,010
35	Túi chứa rác thải lây nhiễm	Cái	0,0001
36	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
37	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
38	Dung dịch nước rửa tay Microshiel	ml	1,000
39	Khăn lau tay	Cái	0,030

40	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
41	Nhãn mã vạch	Cái	4,000
42	QC (nếu thực hiện) *		0,1
43	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Chủng vi khuẩn lao (môi trường đặc hoặc lỏng)

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 chủng vi khuẩn

- Môi trường đặc: ống chủng thuần khiết, đã định danh MTB (+)

Pha độ đục tương đương McFarland 0,5

Pha loãng 1:5

- Môi trường lỏng: Ống MGIT (+) đã định danh MTB (+).

Nếu: Máy báo dương ngày 1, 2 không pha loãng

Máy báo dương ngày 3 - 5; pha loãng 1:5

Máy báo dương > 5 ngày: cấy lại ống MGIT khác.

2. Chuẩn bị nồng độ PZA

Pha 2,5 ml nước cất. Hòa tan hoàn toàn.

Cho 0,1 ml vào tuýp MGIT 7 ml (cho 1 bệnh phẩm)

3. Chuẩn bị ống chứng GC

Từ nồng độ Mcfarland số 0,5 pha tỉ lệ 1: 10.

4. Cấy huyền dịch vi khuẩn vào ống chứng và ống PZA

Nồng độ vi khuẩn; 1:5: cấy 0,5 ml ống chứa PZA

1:10: cấy 0,5 ml ống GC

5. Nhập vào máy Bactec-MGIT 960

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Máy Bactec-MGIT tự động kiểm tra 60 phút/ 1 lần. Khi có dấu hiệu kết quả, máy sẽ báo trên màn hình và in kết quả xét nghiệm. Kết quả trong vòng 4 - 21 ngày.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Nồng độ vi khuẩn pha quá đặc. Máy báo không phân tích được.
- Pha nồng độ thuốc, nồng độ vi khuẩn đảm bảo chính xác.

27. *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện các chủng *M. tuberculosis* nhạy cảm với pyrazinamide.

2. Nguyên lý

Phát hiện enzym pyrazinamidase ở chủng *M. tuberculosis* bằng phản ứng tạo màu đỏ nâu từ sự kết hợp của pyrazinoic với sắt 2. Chủng *M. Tuberculosis* có enzym pyrazinamidase sẽ nhạy cảm với pyrazinamide, chủng không có enzym pyrazinamidase sẽ đề kháng với pyrazinamide.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Tủ ẩm
- Cân phân tích
- Tủ đồ môi trường
- Vortex
- Tủ lạnh
- Nồi hấp (khử nhiễm và hấp sạch)

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	Middlebrook 7H11	mg	200,000
2	Glyxerol	ml	0,600
3	Pyrazinamide	mg	1,000
4	Sodium pyruvate	mg	20,000
5	Ferrous ammonium sulfate (sắt 2)	g	0,200
6	Nước cất	ml	30,000
7	Presept	viên	0,010

8	Tuýp thủy tinh nắp xoáy	cái	1,200
9	Pipet nhựa vô trùng	cái	3,000
10	Que cấy nhựa vô trùng	cái	1,500
11	Đầu côn loại 1ml	cái	2,000
12	Bông	Kg	0,001
13	Cồn 96 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
14	Panh	Cái	0,0001
15	Khay, giá đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
16	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
17	Chai thủy tinh 500 ml	Cái	0,0001
18	Chai thủy tinh 100 ml	Cái	0,0001
19	Ống đong 500 ml	Cái	0,0001
20	Mũ	Cái	0,020
21	Khẩu trang N95	Cái	0,050
22	Găng tay	Đôi	3,000
23	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
24	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
25	Túi chứa rác thải lây nhiễm	Cái	0,0001
26	Khăn giấy vệ sinh các bàn làm việc	Tờ	2,000
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Túi chứa rác thải lây nhiễm	Cái	0,0001
30	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
31	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
32	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
33	Khăn lau tay	Cái	0,030
35	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
36	Nhãn mã vạch	Cái	4,000
37	QC (nếu thực hiện) *		0,1
38	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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: Chứng vi khuẩn lao

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 chủng vi khuẩn

Vi khuẩn lao thuần nhất.

2. Chuẩn bị môi trường PZA

3. Chuẩn bị chứng dương (H37RV hoặc *M. avium*) và chứng âm (*M. bovis* BCG) cho mỗi mẻ thử nghiệm.

4. Các bước

- Gặt nhiều khuẩn lạc vi khuẩn lao (ở các vị trí khác nhau của ống chủng)
- Cho lên bề mặt của ống môi trường PZA
- Ủ ấm 37⁰C/ 4 ngày
- Pha dung dịch 1 % sắt II.
- Nhỏ 1 ml dd 1% sắt II lên bề mặt ống PZA
- Đọc kết quả phản ứng sau 30 phút

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dương tính: Xuất hiện băng màu hồng hoặc đỏ nâu: Kết luận: Nhạy cảm với PZA
- Âm tính : Không có băng màu: Kết luận: Kháng với PZA
- Không khẳng định được kết quả: làm lại thử nghiệm

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Chuẩn bị môi trường đảm bảo chất lượng, bảo quản môi trường ở nhiệt độ 2-8⁰C.

Chỉ chuẩn bị dung dịch Fe 1% vào ngày thứ 4, ủ ấm ống môi trường khi đọc kết quả thử nghiệm

Chỉ sử dụng Fe II làm thử nghiệm. Nếu Fe III sẽ không cho phản ứng tạo màu.

Dùng nền đen để so màu sẽ tạo sự tương phản tốt.

28. *Mycobacterium tuberculosis* định danh và kháng RMP XPERT

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt của gen đặc trưng cho *M. tuberculosis* và phát hiện kháng Rifampicin (RMP)

2. Nguyên lý

Xét nghiệm Xpert MTB/RIF được thiết kế để nhận đoạn trình tự 192bp của gene rpoB trên vi khuẩn lao bằng phản ứng PCR (heminested real-time PCR) . Trình tự các đoạn mồi và 5 mẫu dò được thiết kế đặc biệt để có khả năng phát hiện đột biến cao nhất và đảm bảo chắc chắn xác định được vùng thường xuyên xảy ra đột biến chứa 81bp. Mẫu dò huỳnh quang chứa trình tự có thể cặp đôi với AND của chủng hoang dại. Chỉ cần một mẫu dò không bắt cặp là dấu hiệu có đột biến kháng Rif.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống GeneXpert MTB/RIF
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy Scan mã vạch 2D
- Máy tính điều khiển phần mềm
- Máy in (không bắt buộc)
- UPS 1500 AV

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	Giá 1 test bao gồm Cartridge, Dung dịch đệm RS, 1 pipet nhựa	test	1,200
2	Tuýp Falcon 50 ml	tuýp	1,100
3	Găng tay	đôi	1,000

4	Khẩu trang N95	cái	0,500
5	Khăn giấy	cuộn	0,200
6	Bút đánh dấu	cái	0,010
7	Nhãn mã vạch	Cái	2,000
8	QC (nếu thực hiện) *		0,1
9	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 đờm có thể tích tối thiểu là 1ml, tối đa 3ml và có chất nhầy mủ, không được lẫn các dị vật (máu, mảnh vụn thức ăn, đất,...)

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)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Xử lý mẫu bệnh phẩm

2.2. Cho mẫu vào Xpert Cartridge

2.3. Vận hành máy GeneXpert

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Máy báo trên ô “Test Result”	Trả kết quả trên phiếu Xét nghiệm
MTB NOT DETECTED	√ vào cột tương ứng
MTB DETECTED	√ vào cột tương ứng
Rif Resistance DETECTED	
MTB DETECTED	√ vào cột tương ứng
Rif Resistance NOT DETECTED	

MTB DETECTED Rif Resistance INDETERMINATE	Ghi vào cột “Khác”: Có vi khuẩn lao và không xác định được kháng Rifampicin
MTB INVALID	Ghi vào cột “Khác”: Không hợp lệ
MTB No RESULT	Ghi vào cột “Khác”: Không có kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Sự cố	Giải thích	Xử lý
5006/5007/5008/ 5009	Sai thể tích tra mẫu vào Cartridge: quá ít hoặc quá nhầy	Lặp lại xét nghiệm
2008/2009	Lỗi phần áp lực vì mẫu quá nhầy hay bị màng lọc	Lặp lại xét nghiệm
INVALID	Đối chứng SPC không được nhân gene	Lặp lại xét nghiệm
NO RESULT	Người sử dụng ấn vào nút STOP hoặc Mất điện	Lặp lại xét nghiệm
ERROR	Lỗi hoá chất/Cartridge	Lặp lại xét nghiệm
Quét mã trên Cartridge	Không nghe thấy tiếng BÍP khi khởi động hệ thống	Cắm lại máy quét mã vạch từ cổng USB khác.
	Không nhận mã vạch khi quét	Kiểm tra lại phần cài đặt máy quét mã vạch.

29. *Mycobacterium tuberculosis* đa kháng LPA

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện các gene *rpoB* (mã hóa cho tiểu phần β của RNA polymerase) đột biến mã hóa cho khả năng kháng Rifampicin, gene *Kat G* (gene mã hóa cho enzyme catalase – peroxidase) đột biến mã hóa cho khả năng kháng Isoniazid ở mức độ cao trên và gene *inhA* (mã hóa cho một NADH enoyl ACP reductase) đột biến mã hóa cho khả năng kháng Isoniazid ở mức độ thấp của các chủng *M. tuberculosis*.

2. Nguyên lý

Kỹ thuật Genotype MTBDR_{plus} dựa trên công nghệ LPA (Line Probe Assay) bao gồm kỹ thuật PCR và gắn kết các đoạn gene sau khi được nhân lên vào màng lai (STRIP) đã gắn sẵn các mẫu dò chuyên biệt (oligonucleotide probes). Mẫu dò cho phép xác định vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis* complex) có thể liên kết đặc hiệu với các đoạn gene được nhân lên từ các loài thuộc nhóm này.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Tủ thao tác PCR có đèn tím
- Máy ly tâm an toàn (có nắp đậy từng cối) cho tuýp 50ml
- Máy ly tâm lạnh cho tuýp 1.5ml
- Máy ủ nhiệt khô/ướt
- Máy siêu âm (Ultrasonic)
- Máy PCR
- Lò vi sóng (Microwave Oven)
- Bộ điện di
- Máy lai GT Blot 20

- Tủ lạnh 4°C và tủ lạnh - 20°C
- Nồi hấp khử trùng
- Tủ sấy
- Máy vortex
- Pipette tự động các loại 10P, 20P, 1000P
- Panh, kẹp (Forceps)
- Máy ly tâm mini (Spin down)
- Đồng hồ hẹn giờ

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	MTBDR <i>plus</i> (thế hệ 2)	test	1,370
2	NALC	gam	0,450
3	Nước tinh sạch pha PCR mix	ml	0,700
4	NaOH	gam	0,650
5	Natri Citrat	gam	0,550
6	Thạch điện di	gam	0,100
7	TAE x50	ml	0,500
8	Ethidium Bromid	ml	0,050
9	Nước cất hai lần (ly tâm - Lai DNA)	ml	90,000
10	Tuýp Falcon 50 ml	tuýp	1,200
11	Đầu cân 10 µl	hộp	0,050
12	Đầu cân 100 µl	hộp	0,050
13	Đầu cân 1000 µl	hộp	0,070
14	Eppendorf 0,2 ml	cái	1,200
15	Eppendorf 1,5 ml	cái	2,40
16	Pipette nhựa 5 ml	cái	1,200
17	Pipette nhựa 20 ml	cái	1,000
18	Găng tay	đôi	1,000
19	Khẩu trang N95	cái	1,000
20	Khăn giấy	cuộn	0,020
21	Cồn 70°	ml	20,000
22	Bút MARKER	cái	0,010

23	Bút chì kim 2B	cái	0,010
24	Băng dính trong	cuộn	0,010
25	Nhãn mã vạch	Cái	2,000

3. Bệnh phẩm

Đờm AFB dương tính/ âm tính; dịch phế quản, dịch màng phổi, dịch hút khí quản; chủng vi khuẩn nuôi cấy lao môi trường lỏng/ đặc.

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).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Xử lý mẫu bệnh phẩm

2.2. Tách chiết DNA

2.3. Phản ứng khuếch đại

2.4. Lai tự động trên máy GT-blot 20

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

STT	Băng tín hiệu trên thanh STRIP	Trên phiếu dán thanh STRIP	Trên phiếu trả kết quả
1	Vùng đối chứng CC (AC) xuất hiện tín hiệu		
1.1	TUB không hiện băng	Đánh dấu ở cột TUB “N”	Không tìm thấy vi khuẩn lao trong mẫu này
1.2	TUB hiện băng	Đánh dấu ở cột TUB “P”	Tìm thấy vi khuẩn lao trong mẫu
1.2.1	Các vùng đối chứng của rpoB/KatG, inhA không xuất hiện		Không xác định được có tính kháng R/H hay không
1.2.2	Các vùng đối chứng của rpoB/KatG, inhA xuất hiện		
	Tất cả các dải băng-hoang-dại (WT) đều	Đánh dấu ở cột WT của gene tương ứng	

STT	Bảng tín hiệu trên thanh STRIP	Trên phiếu dán thanh STRIP	Trên phiếu trả kết quả
	xuất hiện tín hiệu	là “P”.	
	Ít nhất 1 trong số các dải băng-hoang-dại (WT) không xuất hiện tín hiệu	Đánh dấu ở cột WT của gene tương ứng là “N”	
	Tất cả các băng-đột-biến (MUT) đều không xuất hiện tín hiệu	Đánh dấu ở cột MUT của gene tương ứng “N”	
	Ít nhất 1 trong số các băng-đột-biến (MUT) xuất hiện tín hiệu	Đánh dấu ở cột MUT của gene tương ứng “P”	
	Ở cột WT của gene tương ứng là “N” <u>và/hoặc</u> ở cột MUT của gene tương ứng “P”	Đánh dấu ở cột resistant của gene tương ứng “+”	Kháng thuốc ở gene tương ứng (R/H)
	Ở cột WT của gene tương ứng là “P” và ở cột MUT của gene tương ứng “N”	Đánh dấu ở cột sensitive của gene tương ứng “+”	Nhạy cảm ở gene tương ứng (R/H)
2	Vùng đối chứng CC không xuất hiện tín hiệu		Không nhận định được kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Lỗi	Giải thích
Các băng tín hiệu đều yếu kể cả băng CC	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - Nhiệt độ phòng quá thấp hoặc hóa chất không được đưa về đến nhiệt độ phòng. - Nhiệt độ ủ quá thấp - Lượng CON-C và/hoặc SUB-C không đủ - Hóa chất hết hạn

Các băng tín hiệu đều yếu hoặc không có, trừ băng CC	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - PNM và HotstarTaq DNA Polymerase rã đông quá nhiều lần (tối ưu 5-6 lần) - PNM, HotstarTaq DNA Polymerase và các thành phần khác của Master Mix bị gia nhiệt. Sử dụng hộp giữ lạnh. - Nhiệt độ ủ quá cao hoặc quá thấp - Độ thuần, tinh sạch trong quá trình xử lý mẫu - Có chất ức chế trong quá trình tách DNA ảnh hưởng đến quá trình nhân gene. - Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên agarose 2%. Nếu không thấy có sản phẩm PCR thì lặp lại bước tách chiết DNA và PCR; Nếu xuất hiện băng mờ thì tăng lượng mẫu DNA từ 5ml thành 8ml; Nếu các băng sản phẩm PCR nhòe thì pha loãng lượng mẫu DNA.
Các băng được nhuộm màu không đều	- Thanh Strips không hoàn toàn ngập trong dung dịch lai - Lắc khay có vấn đề trong khi lai
Màu nền bị đậm	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - CON-C và/hoặc SUB-C quá đậm đặc - Không đủ dung dịch rửa, bước rửa không sạch - Dung dịch rửa quá lạnh so với nhiệt độ phòng (25oC) - Phụ thuộc vào lượng DNA đem lai mà màu nền có thể đậm hơn. - Trong trường hợp này thì ngắt SUB-D ngay khi các băng tín hiệu đã nhìn rõ để tránh bị nhòe băng.
Các yếu tố khác ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm	- Nhiệt độ ủ sai - Dung dịch lai và nước rửa không được làm ấm và pha trộn trước khi thực hiện. - Nhiễm DNA trong bước tách chiết hoặc/và trong hóa chất sử dụng. Trong trường hợp các hóa chất PCR bị nhiễm thì mẫu đối chứng âm cũng xuất hiện băng. - Bị nhiễm bởi các giếng bên cạnh trong quá trình bổ sung dung dịch lai.

30. *Mycobacterium tuberculosis* siêu kháng LPA

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt của gene *gyrA* (mã hóa cho enzym DNA gyrase) đột biến tạo khả năng đề kháng fluoroquinolones (ofloxacin và moxifloxacin), gene rRNA 16S (*rrs*) đột biến tạo khả năng đề kháng của các peptit aminoglycosides/cyclic (các thuốc tiêm capreomycin, viomycin/kanamycin, amikacin), gene *embB* (mã hóa enzym arabinosyl transferase) đột biến tạo khả năng đề kháng ethambutol của *M. tuberculosis*.

2. Nguyên lý

Kỹ thuật Genotype MTBDRsl dựa trên công nghệ LPA (Line Probe Assay) bao gồm kỹ thuật nhân gene (PCR) và gắn kết các đoạn gene sau khi được nhân lên vào màng lai (STRIP) đã gắn sẵn các mẫu dò chuyên biệt (oligonucleotide probes). Mẫu dò cho phép xác định vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis* complex) có thể liên kết đặc hiệu với các đoạn gene được nhân lên từ các loài thuộc nhóm này.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Tủ thao tác PCR có đèn tím
- Máy ly tâm an toàn (có nắp đậy từng cối) cho tuýp 50ml
- Máy ly tâm lạnh cho tuýp 1.5ml
- Máy ủ nhiệt khô/ướt
- Máy siêu âm (Ultrasonic)
- Máy PCR
- Lò vi sóng (Microwave Oven)
- Bộ điện di
- Máy lai GT Blot 20

- Tủ lạnh 4°C và tủ lạnh -20oC
- Nồi hấp khử trùng
- Tủ sấy
- Máy vortex
- Pipette tự động các loại 10P, 20P, 1000P
- Panh, kẹp (Forceps)
- Máy ly tâm mini (Spin down)
- Đồng hồ hẹn giờ

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	MTBDRsl	test	1,370
2	NALC	gam	0,450
3	Nước tinh sạch pha PCR mix	ml	0,700
4	NaOH	gam	0,650
5	Natri Citrat	gam	0,550
6	Thạch điện di	gam	0,100
7	TAE x50	ml	0,500
8	Ethidium Bromid	ml	0,050
9	Nước cất hai lần (ly tâm - Lai DNA)	ml	90,000
10	Tuýp Falcon 50 ml	tuýp	1,200
11	Đầu côn 10 µl	hộp	0,050
12	Đầu côn 100 µl	hộp	0,050
13	Đầu côn 1000 µl	hộp	0,070
14	Eppendorf 0,2 ml	cái	1,200
15	Eppendorf 1,5 ml	cái	2,400
16	Pipette nhựa 5 ml	cái	1,200
17	Pipette nhựa 20 ml	cái	1,000
18	Găng tay	đôi	1,000
19	Khẩu trang N95	cái	1,000
20	Khăn giấy	cuộn	0,020
21	Cồn 70°	ml	20,000
22	Bút MARKER	cái	0,010

23	Bút chì kim 2B	cái	0,010
24	Băng dính trong	cuộn	0,010
25	Nhãn mã vạch	Cái	3,000
26	QC (nếu thực hiện) *		0,1
27	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Thực hiện xét nghiệm MTBDRsl chủng vi khuẩn nuôi cấy lao lỏng/đặc.

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).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Xử lý mẫu bệnh phẩm

2.2. Tách chiết DNA

2.3. Phản ứng khuếch đại

2.4. Lai tự động trên máy GT-blot 20

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

STT	Bảng tín hiệu trên thanh STRIP	Trên phiếu dán thanh STRIP	Trên phiếu trả kết quả
1	Vùng đối chứng CC (AC) xuất hiện tín hiệu		
1.1	TUB không hiện băng	Đánh dấu ở cột TUB “N”	Không tìm thấy vi khuẩn lao trong mẫu này
1.2	TUB hiện băng	Đánh dấu ở cột	Tìm thấy vi khuẩn lao

STT	Bảng tín hiệu trên thanh STRIP	Trên phiếu dán thanh STRIP	Trên phiếu trả kết quả
		TUB “P”	trong mẫu
1.2.1	Các vùng đối chứng của <i>gyrA/rrs/embB</i> không xuất hiện		Không xác định được có tính kháng fluoroquinolones/ peptit aminoglycosides/cyclic/ ethambutol hay không
1.2.2	Các vùng đối chứng của <i>gyrA/rrs/embB</i> xuất hiện		
	Tất cả các dải băng-hoang-dại (WT) đều xuất hiện tín hiệu	Đánh dấu ở cột WT của gene tương ứng là “P”.	
	Ít nhất 1 trong số các dải băng-hoang-dại (WT) không xuất hiện tín hiệu	Đánh dấu ở cột WT của gene tương ứng là “N”	
	Tất cả các băng-đột-biến (MUT) đều không xuất hiện tín hiệu	Đánh dấu ở cột MUT của gene tương ứng “N”	
	Ít nhất 1 trong số các băng-đột-biến (MUT) xuất hiện tín hiệu	Đánh dấu ở cột MUT của gene tương ứng “P”	
	Ở cột WT của gene tương ứng là “N” và/hoặc ở cột MUT của gene tương ứng “P”	Đánh dấu ở cột resistant của gene tương ứng “+”	Kháng thuốc ở gene tương ứng (fluoroquinolones/ peptit aminoglycosides/cyclic/ ethambutol)
	Ở cột WT của gene tương ứng là “P “ và ở cột MUT của gene tương ứng “N”	Đánh dấu ở cột sensitive của gene tương ứng “+”	Nhạy cảm ở gene tương ứng (fluoroquinolones/ peptit aminoglycosides/cyclic/ ethambutol)
2	Vùng đối chứng CC không xuất hiện tín hiệu		Không nhận định được kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Lỗi	Giải thích
Các băng tín hiệu đều yếu kể cả băng CC	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - Nhiệt độ phòng quá thấp hoặc hóa chất không được đưa về đến nhiệt độ phòng. - Nhiệt độ ủ quá thấp - Lượng CON-C và/hoặc SUB-C không đủ - Hóa chất hết hạn
Các băng tín hiệu đều yếu hoặc không có, trừ băng CC	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - PNM và HotstarTaq DNA Polymerase đã đông quá nhiều lần (tối ưu 5-6 lần) - PNM, HotstarTaq DNA Polymerase và các thành phần khác của Master Mix bị gia nhiệt. Sử dụng hộp giữ lạnh. - Nhiệt độ ủ quá cao hoặc quá thấp - Độ thuần, tinh sạch trong quá trình xử lý mẫu - Có chất ức chế trong quá trình tách DNA ảnh hưởng đến quá trình nhân gene. - Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên agarose 2%. Nếu không thấy có sản phẩm PCR thì lặp lại bước tách chiết DNA và PCR; Nếu xuất hiện băng mờ thì tăng lượng mẫu DNA từ 5ml thành 8ml; Nếu các băng sản phẩm PCR nhòe thì pha loãng lượng mẫu DNA.
Các băng được nhuộm màu không đều	- Thanh Strips không hoàn toàn ngập trong dung dịch lai - Lắc khay có vấn đề trong khi lai
Màu nền bị đậm	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - CON-C và/hoặc SUB-C quá đậm đặc - Không đủ dung dịch rửa, bước rửa không sạch - Dung dịch rửa quá lạnh so với nhiệt độ phòng (25oC) - Phụ thuộc vào lượng DNA đem lai mà màu nền có thể đậm hơn. - Trong trường hợp này thì ngắt SUB-D ngay khi các băng tín hiệu đã nhìn rõ để tránh bị nhòe băng.

Các yếu tố khác ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm	- Nhiệt độ ủ sai - Dung dịch lai và nước rửa không được làm ấm và pha trộn trước khi thực hiện. - Nhiễm DNA trong bước tách chiết hoặc/và trong hóa chất sử dụng. Trong trường hợp các hóa chất PCR bị nhiễm thì mẫu đối chứng âm cũng xuất hiện băng. - Bị nhiễm bởi các giếng bên cạnh trong quá trình bổ sung dung dịch lai.

31. *Mycobacterium tuberculosis* PCR hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định DNA đặc trưng của *Mycobacterium tuberculosis*

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy COBAS[®]TaqMan 48 Analyzer (Roche) và hệ thống máy vi tính (VD).
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm thường
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰ C) hoặc (- 80⁰C) (nếu có)
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 30 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	Test	0,001
8	Lọ nhựa vô trùng	Cái	2,000
9	Găng không có bột tal	Đôi	0,100
10	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,100
12	Ngoại kiểm (nếu có)*		
13	Kít tách DNA	Test	1,050
14	Ống Falcol 50ml	Cái	0,010
15	Ependoff 1,7ml	Tube	2,000
16	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	2,000
17	Đầu côn 30 µl	Cái	2,000
18	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,000
19	Đầu côn 1ml có lọc	Cái	2,000
20	K-Tube Rack, for CTM	Cái	1,050
21	Giấy thấm	Cuộn	0,100
22	Giấy xét nghiệm	Tờ	3,000
23	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
24	Bút viết kính	Cái	0,020
25	Bút bi	Cái	0,010
26	Mũ	Cái	0,020
27	Khẩu trang	Cái	0,020
28	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
29	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
30	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
31	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
32	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
33	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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

Đờm, dịch phế quản, dịch não tủy, các loại dịch khác, mảnh sinh thiết, 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

Bộ sinh phẩm COBAS®TaqMan MTB test - Roche (VD)

2.1. Thu nhận và Xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết DNA

2.2. Tách chiết DNA

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Khuếch đại DNA, đọc kết kết trên máy COBAS® TaqMan 48

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng âm: không phát hiện (Target Not Detected).
- Chứng dương: Dương tính (1Positive)

* Không nhận các kết quả của chứng không có giá trị khi xuất hiện thông báo lỗi (cờ báo flags):

- Chứng âm: Invalid (không giá trị)
- Chứng dương: Invalid (không giá trị)

2. Phân tích mẫu

- **Mẫu dương tính:** 1 Positive hoặc > 1 Positive
- **Mẫu âm tính:** Target Not Detected

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

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

32. *Mycobacterium tuberculosis* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gene đặc trưng của *Mycobacterium tuberculosis* trong các loại bệnh phẩm (đờm, dịch phết quần, các loại dịch sinh học, phân hoặc mảnh sinh thiết).

2. Nguyên lý

Xác định sự có mặt gene đặc trưng của *Mycobacterium tuberculosis* dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 10 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Lọ vô trùng	Cái	1.000
2	Bơm kim tiêm 10 ml	Cái	1,000

3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001
5	Găng không có bột tal	Đôi	0,020
6	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
7	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,300
8	Kit tách DNA	Test	1,300
9	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
10	Ống Falcol 50ml	Cái	1,000
11	Ependoff 1,7ml	Tube	2,200
12	Ependoff 0,2ml	Tube	2,200
13	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	2,200
14	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
15	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
16	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
25	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
26	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
27	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
28	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
29	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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, dịch phế quản, dịch não tủy, các loại dịch khác, mảnh sinh thiết, 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).
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (Xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm *Mycobacterium tuberculosis* PCR Kit - GeneProof (VD)

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

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đã đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR 0,2 ml cần dùng. Phân phối MasterMix vào từng tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube MasterMix Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu và chứng trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “JOE” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình 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 FAM tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (**đường biểu diễn dương tính**) và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu JOE 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 FAM âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu JOE dương tính

2. Phân tích mẫu

- Mẫu dương tính: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng và bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu từ sau chu kỳ 36 → 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 VÀ XỬ TRÍ

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân: Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.
- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

33. *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotyping

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

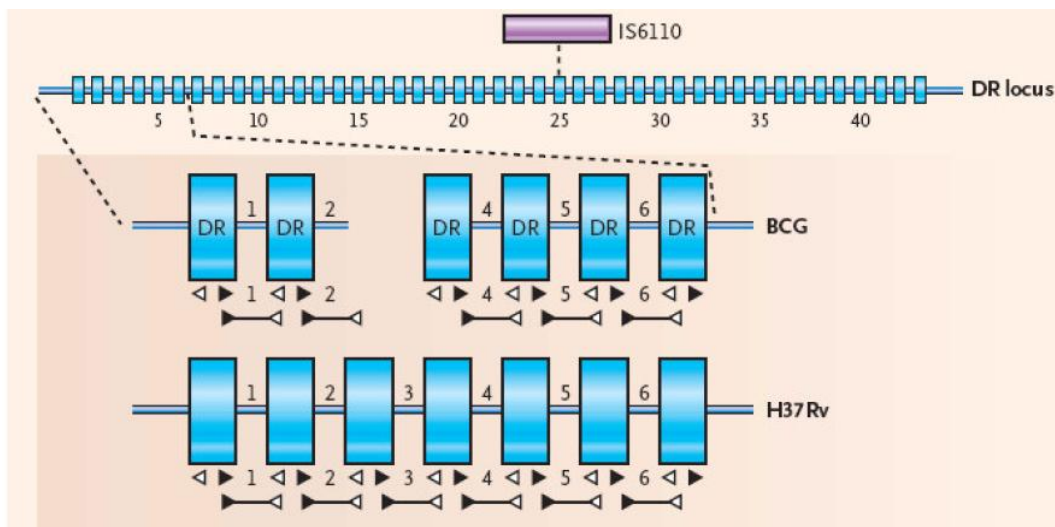
1. Mục đích

Phân nhóm di truyền các chủng *M. tuberculosis*.

2. Nguyên lý

Phương pháp Spoligotyping (Spacer Oligonucleotide Typing) dựa trên nguyên tắc của phương pháp lai phân tử Southern blot. Các trình tự chuyên biệt trên các chủng *Mycobacterium tuberculosis* được nhân gene (PCR) và lai với các đoạn nucleotide đặc hiệu.

Trên DNA của các chủng *M. tuberculosis* có một trình tự bảo tồn đặc biệt chỉ có ở các chủng này được gọi là Direct Repeat (DR), kích thước khoảng 36bp. Giữa các DR này là các spacer kích thước khoảng 35bp đến 41 bp. Có 43 spacer được xác định ở *M. tuberculosis*. Sự có mặt hoặc thiếu hụt các trình tự này được xác định bằng lai ghép sản phẩm PCR với 43 oligonucleotide tổng hợp từ các trình tự đệm của *M. tuberculosis* H37Rv. Spoligotyping có thể phân biệt được các chủng thuộc nhóm *M. tuberculosis* dựa trên sự mất hoặc hiện diện các DR được phân tích, so sánh với dữ liệu spoligotyping quốc tế SpolDB4. Khả năng mất các đoạn DR có thể xảy ra nhiều lần, độc lập ở các chủng, dẫn đến sự tiến hóa, xuất hiện các nhóm spoligotype khác nhau.



Hình 1. Các vùng DR trên bộ gene *M. tuberculosis*

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 ATSH cấp II
- Máy siêu ly tâm tuýp 1.5ml
- Máy ly tâm mini (Spin down)
- Máy ủ nhiệt khô/ướt
- Máy siêu âm (Ultrasonic)
- Máy nhân gene
- Lò vi sóng (Microwave Oven)
- Bộ điện di
- Máy vortex
- Máy lắc ngang
- Tủ lạnh 4° /- 20°/-80°
- Máy đọc gel
- Miniblotter
- Cân điện tử
- Pipette tự động loại 10, 200, 1000µl.
- Panh, kẹp (Forceps)
- Tủ sấy
- Nồi hấp khử trùng
- Tủ thao tác PCR
- Đồng hồ hẹn giờ
- Hộp giữ lạnh
- Lò lai DNA
- Hộp ủ phim X-ray
- Hộp rửa phim
- Hệ thống buồng tối tráng phim
- Hệ thống máy tính

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
I	Hóa chất		
1	PuReTag PCR Beads	test	1,500
2	Dra gắn Biotinylated 5''	µl	0,500
3	Drb	µl	0,500
4	Thạch điện di	gam	0,100
5	TAE x50	ml	0,500
6	Ethidium Bromid	ml	0,050
7	Streptavidin - POD- Conjugate	ml	0,500
8	ECL Detection Reagents (1 + 2)	ml	0,500
9	Amersham Hyperfilm ECL (18 * 24 cm)	Tờ	0,100
10	Miếng đệm	Tờ	0,100
11	SDS	gam	0,700

12	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	gam	0,500
13	EDTA	gam	0,500
14	NaCl	gam	2,500
15	NaOH	gam	0,100
16	Tris-HCl	gam	0,100
17	Boric Acid	gam	0,100
18	Deverlop Film	ml	10,000
19	Nước tinh sạch (pha PCR Mix)	ml	0,500
20	Nước cất hai lần (pha buffer)	lít	0,500
II	Vật tư tiêu hao		
21	Đầu côn 10 µl	cái	3,000
22	Đầu côn 100 µl	cái	4,000
23	Đầu côn 1000 µl	cái	3,000
24	Eppendorf 0,2 ml	cái	2,000
25	Eppendorf 1,5 ml	cái	1,000
26	Găng tay	đôi	1,000
27	Khẩu trang N95	cái	1,000
28	Khăn giấy	cuộn	0,020
29	Cồn 70°	ml	10,000
30	Bút MARKER	cái	0,010
31	Bút chì kim 2B	cái	0,010
32	QC (nếu thực hiện) *		0,1
33	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Thực hiện xét nghiệm phân nhóm *M. tuberculosis* cho các bệnh phẩm là chủng vi khuẩn lao mọc trên môi trường đặc hoặc 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)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Lập danh sách, cập nhập thông tin mẫu cần xét nghiệm.

2.2. Xử lý mẫu theo danh sách đã trích lọc

2.3. Tách chiết DNA vi khuẩn theo quy trình chuẩn

2.4. Thực hiện phản ứng nhân gene

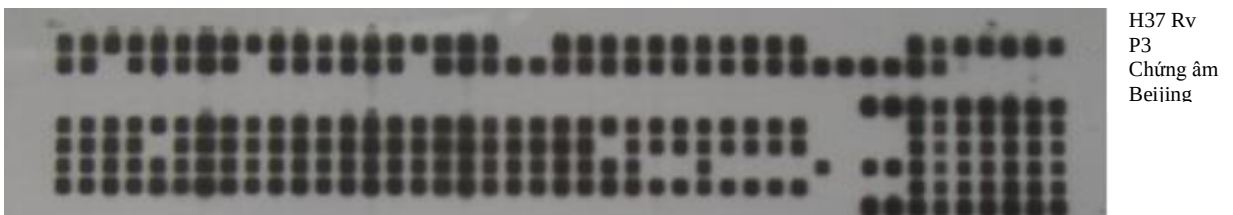
2.5. Lai sản phẩm PCR với màng lai Biodyne C

2.6. Phát hiện tín hiệu lai

2.7. Xử lý và phân tích kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Tín hiệu lai được thể hiện bằng những ô màu đen. Mỗi chấm đen tương ứng với một đoạn đệm. Phim được đọc từ trái sang phải và từ trên xuống dưới. Hai chủng đầu tiên được sử dụng làm mẫu chứng dương là H37Rv và P3. Một mẫu chứng âm là nước cất giúp kiểm soát các trường hợp dương tính giả, đồng thời kiểm tra sự nhiễm chéo giữa các rãnh lai DNA.



Hình 2. Kết quả Spoligotyping

Các tín hiệu lai được nhập vào máy tính và xử lý trên phần mềm Bionumeric. Chủng Beijing có kết quả từ vị trí 1-34 là nốt trắng, vị trí số 35 đến 43 là các nốt đen. Các chủng khác cũng sẽ được xác định và nhóm theo từng phân nhóm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Lỗi	Giải thích và cách Xử lý
Không có tín hiệu lai được phát hiện	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - Enzym đã bất hoạt. Chia nhỏ lượng enzym, bảo quản theo đúng điều kiện cần thiết và sử dụng hộp giữ lạnh khi pha mix. - Điện di 5 µl sản phẩm PCR trên thạch Agarose 2% để kiểm tra quá trình nhân gene có thang DNA hay không. - Streptavidin peroxidase bất hoạt hoặc nhiệt độ ủ không đúng - Quá trình biến tính chưa tốt. - Hóa chất ủ phim ECL hết hạn - Kiểm tra hoạt tính của màng Biodyne bằng sản phẩm PCR của các chủng chứng dương. Nếu tín hiệu lai yếu thì nên thay màng mới. Thông thường màng dùng được 8-10 lần.
Hình nền quá đậm	- Kiểm tra các rãnh trên Miniblotter có bị nứt mẻ không. - Miniblotter không sạch. Ngâm với Extran (Merck) qua đêm và rửa sạch bằng bàn chải mềm chuyên dụng. - Vặn chặt các ốc vít trên Miniblotter khi lai DNA - Dung dịch, thời gian và nhiệt độ rửa màng không đảm bảo. - Nước rửa phim dùng nhiều lần và thời gian ủ phim quá lâu.
Các yếu tố khác ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm	- Nhiệt độ ủ sai. Dung dịch lai và nước rửa không được ủ ấm trước khi thực hiện. - Nhiễm DNA trong bước tách chiết hoặc/và trong hóa chất sử dụng. Trong trường hợp các hóa chất PCR bị nhiễm thì mẫu đối chứng âm cũng xuất hiện băng. - Bị nhiễm bởi các rãnh bên cạnh trong quá trình bổ sung mẫu lai DNA. - Tín hiệu lai không đều. ECL không được láng đều trên toàn bộ bề mặt của màng lai. - Lộ sáng trong quá trình ủ phim

34. *Mycobacterium tuberculosis* RFLP typing

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

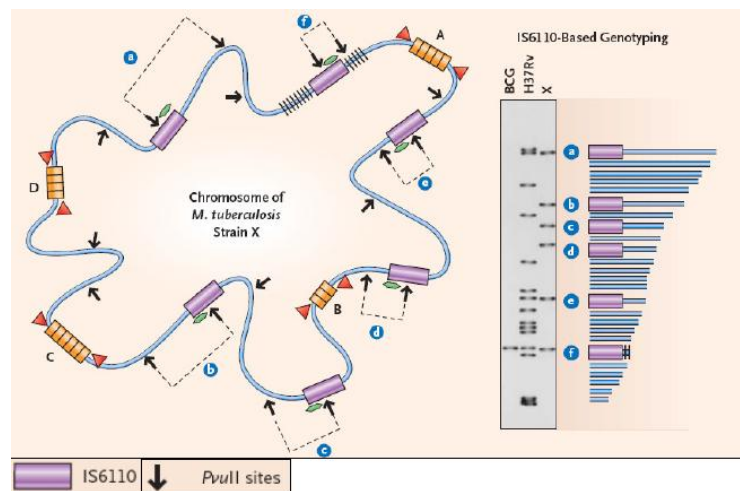
1. Mục đích

Phân nhóm di truyền các chủng *M. tuberculosis*.

2. Nguyên lý

Kỹ thuật phân nhóm vi khuẩn *M. tuberculosis* - Restriction fragment length polymorphism (RFLP) dựa trên phương pháp lai phân tử với mẫu dò đặc hiệu với DNA của vi khuẩn lao được cố định trên màng lai. Tính đa hình về kích thước tạo ra do sự khác biệt về số lượng bản sao và vị trí của các đoạn IS6110 trên nhiễm sắc thể vi khuẩn cho phép phân loại *M. tuberculosis* thành các nhóm nhỏ.

Trên nhiễm sắc thể *Mycobacterium tuberculosis* có các đoạn IS6110. Trên đoạn IS6110 có các vị trí cắt của enzyme cắt giới hạn, đồng thời ngoài đoạn IS6110 cũng có các vị trí cắt giới hạn tương ứng. Sử dụng enzyme cắt giới hạn chia bộ gene vi khuẩn thành nhiều đoạn có kích thước khác nhau. Số lượng bản sao IS6110 khác nhau cho ta số đoạn cắt khác nhau. Điện di, chuyển DNA lên màng lai, lai với mẫu dò đặc hiệu để phát hiện số lượng và kích thước các đoạn cắt.



Hình 1. Vị trí đoạn IS 6110 và enzyme cắt giới hạn PvuII

II. CHUẨN BỊ

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

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất

2.1. Trang thiết bị

- Tủ ATSH cấp II
- Máy siêu ly tâm tuýp 1.5ml
- Máy ly tâm mini (Spin down)
- Máy ủ nhiệt khô/ướt
- Máy siêu âm (Ultrasonic)
- Máy nhân gene
- Lò vi sóng (Microwave Oven)
- Bộ điện di
- Máy vortex
- Máy lắc ngang
- Tủ lạnh 4° /- 20°/-80°
- Hệ thống chụp ảnh điện di
Pringraph
- Hệ thống Vacuum Blotter
- Máy đo nồng độ DNA Smart
Spec™ Plus
- Cân điện tử
- Pipette tự động 10, 200, 1000µl.
- Panh, kẹp (Forceps)
- Tủ sấy
- Nồi hấp khử trùng
- Tủ thao tác PCR
- Đồng hồ hẹn giờ
- Hộp giữ lạnh
- Lò lai DNA
- Hộp ủ phim X-ray
- Hộp rửa phim
- Hệ thống UV Stralinker
- Hệ thống Gel Documentation

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
I	Hóa chất		
1	Protein K	µl	10,000
2	SDS	gam	0,500
3	TE buffer	ml	5,000
4	Lysozym	mg	0,010
5	Chloroform	ml	0,500
6	Alcohol	ml	0,500
7	Isopropanol	ml	0,500
8	Ethanol	ml	0,500
9	CTAB	gam	0,200

10	NaCL	gam	0,500
11	Sodium acetat	gam	0,500
12	TAE buffer	ml	5,000
13	Hybridization buffer solution	ml	5,000
14	SSC buffer stock solution 20 X	ml	1,000
15	ECL Direct Nucleic Acid Labelling System	ml	0,200
16	ECL Detection Reagents	ml	0,200
17	Hot start TagDNA polymerase	µl	0,500
18	100 bp DNA ladder	µl	0,500
19	(CGG) ₅ primer	µl	0,500
20	LightCycler FastStart DNA Master ^{plus} Hybprobe	gam	0,100
21	Pvu II	µl	0,300
22	Alu I	µl	0,300
23	Primer INS 1, 2	µl	0,300
25	SeaKem Gold agarose	gam	0,100
26	Agarose	gam	0,100
27	Ethidium Bromid	ml	0,050
28	Streptavidin - POD- Conjugate	ml	0,500
29	Standard chemical for pH metter	ml	0,500
30	Nước tinh sạch (pha PCR Mix)	ml	0,500
31	Nước cất hai lần (pha buffer)	lít	0,500
II	Vật tư tiêu hao		
32	Đầu cân 10 µl	cái	3,000
33	Đầu cân 100 µl	cái	4,000
34	Đầu cân 1000 µl	cái	3,000
35	Eppendorf 0,2 ml	cái	2,000
36	Eppendorf 1,5 ml	cái	1,000
37	Cryotube 1.5 ml	cái	1,000
38	Giấy tráng kim	Hộp	0,01
39	Capillary(20mcl)	cái	1,000
40	Màng hybbond	cái	0,100

41	Plastic Wrap	Hộp	0,050
42	Găng tay	đôi	1,000
43	Khẩu trang N95	cái	1,000
44	Khăn giấy	cuộn	0,020
45	Cồn 70°	ml	10,000
46	Bút MARKER	cái	0,010

3. Bệnh phẩm

Thực hiện xét nghiệm phân nhóm *M. tuberculosis* cho các bệnh phẩm là chủng vi khuẩn lao mọc trên môi trường đặc.

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)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Lập danh sách, cập nhập thông tin mẫu cần xét nghiệm.

2.2. Xử lý mẫu theo danh sách đã trích lọc

2.3. Tách chiết DNA vi khuẩn theo quy trình chuẩn

2.4. Chuẩn bị thang DNA và mẫu dò IS6110

2.5. Thực hiện phản ứng cắt bằng Enzyme cắt giới hạn

2.6. Ước lượng/đo nồng độ DNA sau phản ứng cắt

2.7. Điện di DNA

2.8. Xử lý gel sau khi điện di

2.9. Chuyển DNA lên màng lai

2.10. Lai với ECL kít

2.11. Rửa màng sau khi lai

2.12. Phát hiện tín hiệu lai bằng ECL

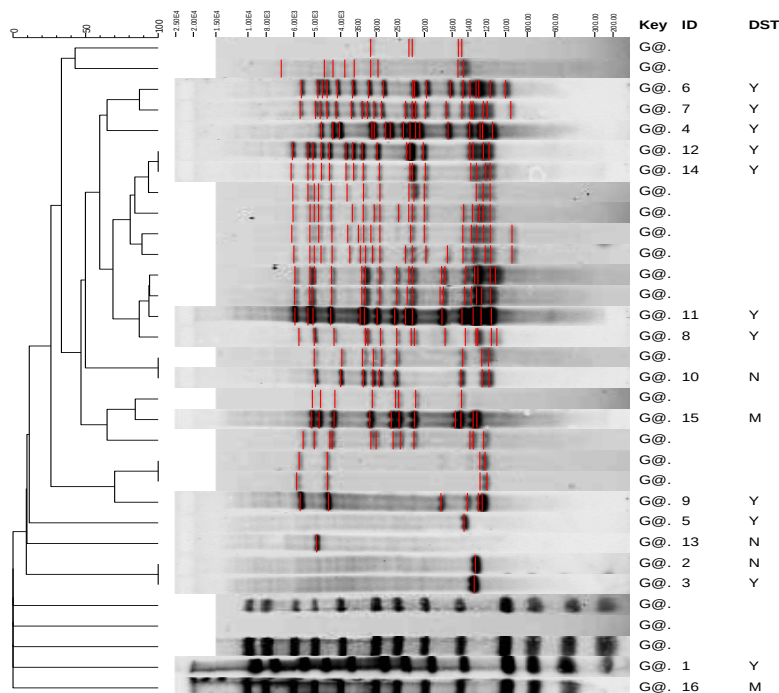
2.13. Đọc và phân tích kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Tín hiệu lai được thể hiện bằng những vạch màu đen trên phim. Scan các phim này vào máy tính và phân tích bằng chương trình Bionumerics. Sau khi

chuẩn hóa các phim, dựa trên hình ảnh các băng vạch, các mẫu chủng sẽ được so sánh với nhau và so với mẫu chuẩn để phân nhóm chủng *M. tuberculosis*.

Trong một số trường hợp khó nhận biết các băng vạch với nhau nên đôi khi kết quả không đồng nhất, cần lặp lại xét nghiệm để xác định kết quả.



Hình 2. Kết quả RFLP được phân tích bằng Bionumerics

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Lỗi	Giải thích và cách Xử lý
Không có tín hiệu lai được phát hiện	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - Enzym đã bất hoạt. Chia nhỏ lượng enzym, bảo quản theo đúng điều kiện cần thiết và sử dụng hộp giữ lạnh khi pha mix. - Điện di 5 µl sản phẩm PCR trên thạch Agarose 2% để kiểm tra quá trình nhân gene có thang DNA hay không. - Enzym cắt mất hoạt tính - Hóa chất ủ phim ECL hết hạn - Kiểm tra quá trình thấm DNA lên màng

Ảnh điện di không đặc hiệu, các đoạn cắt không rõ ràng	- Quá trình tách DNA chưa tốt. DNA không tinh sạch, lẫn nhiều protein. - Enzyme cắt giới hạn (RE) cần được bảo quản tốt trong dung dịch đệm có 50% glycerol ở -20°C. - Khi thực hiện phản ứng cắt bằng RE, cần sử dụng nồng độ NaCl của dung dịch đệm từ thấp đến cao. - Tối ưu hiệu quả hoạt động của Enzyme cắt giới hạn, đảm bảo thể tích RE không quá 1/10 thể tích phản ứng
Các yếu tố khác ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm	- Nhiệt độ ủ sai. Dung dịch lai và nước rửa không được ủ ấm trước khi thực hiện. - Nhiễm DNA trong bước tách chiết hoặc/và trong hóa chất sử dụng. - Tín hiệu lai không đều. ECL quá hạn hoặc ECL không được láng đều trên toàn bộ bề mặt của màng lai. - Đánh số, mã đánh dấu lên màng DNA bằng bút bi để phân biệt các file trên hệ thống máy tính.

35. NTM (Non Tuberculosis Mycobacteria) nuôi cấy môi trường lỏng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện các Mycobacteria không phải là *Mycobacterium tuberculosis* bằng kỹ thuật nuôi cấy môi trường lỏng.

2. Nguyên lý

Tube MGIT chứa môi trường lỏng Middlebrook 7H9 có oxy hòa tan và 1 hợp chất gồm: chất màu huỳnh quang, tris 4, 7-diphenyl-1, 10-phenonthroline ruthenium chloride pentahydrate được gắn vào lớp silicone ở đáy tube. Khi vi khuẩn phát triển oxy bị tiêu thụ, nồng độ oxy giảm, chất màu huỳnh quang thoát ức chế sẽ phát quang trong tube MGIT, có thể quan sát bằng tia UV. Cường độ phát quang tương ứng với mức độ tiêu thụ oxy, tương ứng nồng độ vi khuẩn phát triển trong tube môi trường. Máy tự động giám sát sự phát quang 60 phút một lần. Vi khuẩn mọc càng nhiều càng tăng độ phát quang. Vi khuẩn mọc sẽ được định danh để xác định các Mycobacteria khác không phải là *Mycobacterium tuberculosis*.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy li tâm đủ tiêu chuẩn an toàn sinh học, đủ lực li tâm ($\geq 3000g$).
- Máy lắc
- Tủ lạnh
- Cân
- Đồng hồ phút.
- Kính hiển vi
- Nồi hấp
- Hệ thống máy BACTEC- MGIT 960 hoặc 320

- Pipet tự động loại 100-1000 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	Số lượng
I	Hoá chất		
1	MGIT tuýp loại 7 ml	tuýp	1,100
2	MGIT supplement - PANTA	ml	0,900
3	KH ₂ PO ₄	gam	0,250
4	Na ₂ HPO ₄	gam	0,250
5	Cồn 70 ⁰	ml	5,000
6	Nước cất	ml	60,000
7	NaOH	gam	0,020
8	NaCitrat	gam	0,015
9	NALC	mg	25,000
10	Dầu soi	ml	0,100
11	Cồn 95 ⁰	ml	4,500
12	Cacbol Fuchsin	gam	0,030
13	HCL	ml	0,300
14	Phenol	ml	0,500
15	Methylen	gam	0,030
16	Thanh định danh nhanh (SD, TBcID..)	test	0,400
17	Presept 2,5	viên	0,050
18	Microshiel	ml	1,000
19	Lòng trắng trứng	ml	0,010
II	Vật tư tiêu hao		
20	Lam kính	cái	2,200
21	Tuyp nắp xoáy vô trùng 50ml	cái	1,100
22	Pipette Paster nhựa vô trùng	cái	3,000
23	Chai thủy tinh trung tính 1000ml	cái	0,001
24	Que phết đờm	cái	0,500
25	Giấy lau kính hiển vi	tờ	0,100
26	Bông thấm nước	gam	0,500
27	Đầu côn nhựa loại 1ml	cái	0,010

28	Găng tay	đôi	0,200
29	Tuýp 18 x 24 mm	cái	0,100
30	Bô can	cái	0,010
31	Hộp đựng tiêu bản	cái	0,001
32	Túi nilon loại 2 lớp chịu nhiệt hấp	cái	0,050
33	Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm	cái	0,020
34	Thùng rác có nắp	cái	0,001
35	Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm	cái	0,001
36	Hộp đựng vật sắc nhọn	cái	0,003
37	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,001
38	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	cái	0,001
39	Giá đựng tuýp	cái	0,001
40	Mũ	cái	0,020
41	Khẩu trang	cái	0,020
42	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
43	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
44	Dung dịch tẩy rửa dụng cụ	ml	10,000
45	Bút chì đen HB	cái	0,020
46	Bút bi	cái	0,010
47	Bật lửa	cái	0,010
48	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
49	Khăn lau tay	cái	0,005
50	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
51	Nhãn mã vạch	cái	3,000
52	QC (nếu thực hiện) *		0,1
53	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Đờm, dịch phế quản, phân, mủ, dịch não tủy, các loại dịch khác, ...

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 1 và Phụ lục 4)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị môi trường hóa chất

2.2. Xử lý bệnh phẩm, nhuộm soi, nuôi cấy

2.3. Định danh: soi định danh và định danh nhanh sắc ký miễn dịch

2.4. Xử lý vật liệu lây nhiễm

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Kết quả nhuộm soi:

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

2. Kết quả cấy

- Máy báo tự động mỗi giờ, kết quả dương tính trung bình trong vòng 3 ngày đến 2 tuần
- Kết quả cấy âm tính máy báo sau 6 tuần
- Ngoài ra tuýp cấy máy báo âm tính có đầu vào nhuộm soi dương phải lý tâm lấy cấy nhuộm soi, các tuýp máy báo âm phải quan sát bằng mắt thường phát hiện cấy vụn trước khi hủy

3. Kết quả định danh

3.1. Soi định danh (phân biệt NTM với MTB)

NTM (*Mycobacteria* không phải lao) soi định danh không thấy cuộn thừng, AFB vụn thành đám

3.2. Định danh nhanh bằng sắc ký (SD, TBcID...)(phân biệt NTM với MTB)

NTM (*Mycobacteria* không phải lao) âm tính (có 1 vạch màu tại vị trí “C”)

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Nhiễm chéo trong quá trình thao tác kỹ thuật: hạn chế nhiễm chéo bằng cách phân loại nguồn bệnh phẩm dịch, đờm, nghi MDR, người bệnh thường... để Xử lý thích hợp. Không cấy chuyển chủng không làm tiêu bản soi định danh cùng lúc Xử lý bệnh phẩm. Chia nhỏ hóa chất dung dịch đệm, thao tác nhẹ nhàng tránh tạo hạt mù, chất dung dịch vào thành tuýp. Không mở đồng thời các tuýp mẫu Mỗi mẻ Xử lý 6 - 8 mẫu.
- Tỷ lệ ngoại nhiễm cao: giảm ngoại nhiễm bằng cách Xử lý mẫu càng sớm càng tốt. Mẫu bảo quản 2 - 8⁰C không quá 72 giờ, dịch dạ dày, nước tiểu Xử lý sớm trước 4 giờ kể từ khi lấy mẫu. Tuân thủ quy trình xử lý, nồng độ và thời gian tiếp xúc với hóa chất. Đảm bảo chất lượng môi trường, sinh phẩm, hóa chất, dụng cụ trong hạn và vô trùng.
- Nhầm lẫn hành chính: Kiểm tra cẩn thận về hành chính từ khâu nhận bệnh phẩm, vào sổ, trả kết quả, tránh nhầm lẫn. Khi thao tác kỹ thuật xếp mẫu theo thứ tự, tuân thủ qui tắc để cách ô trống đầu tiên.

36. NTM (Non Tuberculosis Mycobacteria) nuôi cấy môi trường đặc

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện các Mycobacteria không phải *Mycobacterium tuberculosis* bằng kỹ thuật nuôi cấy môi trường đặc.

2. Nguyên lý

Xác định *Mycobacterium tuberculosis* có trong bệnh phẩm dựa vào hình ảnh khuẩn lạc mọc trên môi trường đặc và được xác định khi các thử nghiệm khẳng định MTB cho kết quả âm tính.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy li tâm đủ tiêu chuẩn an toàn sinh học, đủ lực li tâm ($\geq 3000g$).
- Máy lắc
- Tủ lạnh
- Cân
- Đồng hồ phút.
- Kính hiển vi
- Nồi hấp
- Tủ ẩm hoặc buồng ẩm (35 - 38°C)

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
I	Hoá chất		
1	KH_2PO_4	gam	0,300
2	$MgSO_4$	gam	0,0033
3	MgCitrat	gam	0,0084

4	Asparagin	gam	0,051
5	Glyxerol	ml	0,168
6	Malachite	gam	0,0026
7	Na ₂ HPO ₄	gam	0,250
8	Trứng gà	quả	1/3
9	Cồn 70 ⁰	ml	150,000
10	Nước cất	ml	65,000
11	NaOH	gam	0,020
12	NaCitrat	gam	0,015
13	NALC	mg	25,000
14	Dầu soi	ml	0,050
15	Cồn 95 ⁰	ml	4,500
16	Cacbol fuchsin	gam	0,015
17	HCL	ml	0,150
18	Phenol	ml	0,250
19	Methylen	gam	0,015
20	Thanh định danh Niacin	test	0,400
21	Presept 2,5	viên	0,050
22	Microshiel	ml	1,000
II	Vật tư tiêu hao		
23	Tuyp nắp xoáy vô trùng 50ml	cái	1,100
24	Lam kính	cái	1,200
25	Pipette Paster nhựa vô trùng	cái	2,000
26	Que phết đờm	cái	0,500
27	Giấy lau kính hiển vi	tờ	0,100
28	Gạc lọc	mét	0,030
29	Bông thấm nước	gam	0,500
30	Bông mỡ	gam	0,500
31	Pipette nhựa 10ml	cái	0,200
32	Đầu côn nhựa loại 1ml	cái	0,010
33	Găng tay	đôi	0,200
34	Tuýp thủy tinh trung tính nút xoáy	cái	0,300
35	Tuýp 18 x 24 mm	cái	0,100
36	Bô can	cái	0,010
37	Bình cầu 2000ml	cái	0,001
38	ống đong 500 ml	cái	0,001
39	ống đong 50 ml	cái	0,001
40	Phễu thủy tinh 500ml	cái	0,001
41	Cốc mỏ 500ml	cái	0,001
42	Cốc có mỏ 200 ml	cái	0,001
43	Chai thủy tinh trung tính 1000ml	cái	0,002
44	Hộp đựng tiêu bản	cái	0,001
45	Túi nilon loại 2 lớp chịu nhiệt hấp	cái	0,050

46	Túi rác vàng hủy vật liệu lây nhiễm	cái	0,020
47	Thùng rác có nắp	cái	0,001
48	Thùng vận chuyển vật liệu lây nhiễm	cái	0,001
49	Hộp đựng vật sắc nhọn	cái	0,003
50	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,001
51	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	cái	0,001
52	Giá đựng tuýp	cái	0,001
53	Khay đựng môi trường	cái	0,001
54	Mũ	cái	0,020
55	Khẩu trang	cái	0,020
56	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
57	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
58	Dung dịch tẩy rửa dụng cụ	ml	10,000
59	Bút chì đen HB	cái	0,020
60	Bút bi	cái	0,010
61	Bật lửa	cái	0,010
62	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
63	Khăn lau tay	cái	0,005
64	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
65	Nhãn mã vạch	cái	4,000
66	QC (nếu thực hiện) *		0,1
67	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Đờm, dịch phế quản, phân, mủ, dịch não tủy, các loại dịch khác...

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 1 và Phụ lục 4)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị môi trường hóa chất

2.2. Xử lý bệnh phẩm, nhuộm soi, nuôi cấy

2.3. Định danh

2.4. Xử lý vật liệu lây nhiễm

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Kết quả nhuộm soi

AFB có hình ảnh trực khuẩn mảnh, hơi cong, bắt màu đỏ đứng riêng lẻ hay xếp đôi hoặc từng đám trên nền xanh.

Đếm số lượng AFB và ghi kết quả như bảng sau:

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

2. Kết quả cấy

- Kiểm tra nhiễm trùng: sau 24 - 48 giờ
- Kiểm tra sau 72 giờ: mặt môi trường khô, xoáy nắp tuýp tránh bay hơi làm khô môi trường
- Theo dõi trong vòng 7 ngày để phát hiện chủng *Mycobacteria* mọc nhanh
- Đọc kết quả cấy hàng tuần đến 8 tuần.
- Khuẩn lạc nhóm *Mycobacteria* không phải lao (NTM) dạng S trơn bóng, nhày, có hoặc không sắc tố, có thể mọc nhanh trong vòng 7 ngày.

Quy định đánh giá kết quả

Đọc kết quả cấy	Nhận định kết quả cấy
Không thấy khuẩn lạc	Âm tính
1 – 19 khuẩn lạc	Dương tính: số khuẩn lạc
20 – 100 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc mọc 1/3 bề mặt môi trường)	Dương tính: 1 +
100 – 200 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc mọc ½ bề mặt môi trường)	Dương tính: 2 +
200 – 500 khuẩn lạc	Dương tính: 3 +

(ước tính khuẩn lạc mọc 2/3 bề mặt môi trường)	
> 500 khuẩn lạc (ước tính khuẩn lạc phủ kín toàn bộ bề mặt môi trường)	Dương tính: 4 +
Nhiễm vi khuẩn hoặc nấm	Ngoại nhiễm

3. Phân biệt NTM với MTB

- NTM (*Mycobacteria* không phải lao): Niacin âm tính
- NTM: thử nghiệm TBcID cho kết quả âm tính

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Tỷ lệ soi âm cấy dương thấp: có thể do khử tạp quá mạnh (nồng độ hóa chất, thời gian tiếp xúc) làm chết NTM (NTM nhạy cảm với khử tạp hơn so với MTB).
- Tỷ lệ ngoại nhiễm cao: có thể tăng thể tích hoặc nồng độ hóa chất, không kéo dài thời gian khử nhiễm.
- Nhiễm chéo có thể xảy ra, đề phòng nhiễm chéo: mỗi mẻ chỉ Xử lý 6-8 bệnh phẩm không mở đồng thời các tuýp mẫu. Chia nhỏ lượng dung dịch khử nhiễm và dung dịch đệm, không chất trực tiếp dung dịch khử nhiễm hay dung dịch đệm vào bệnh phẩm.

37. NTM (Non Tuberculosis Mycobacteria) LPA

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Định danh các loại mycobacteria không phải *M. tuberculosis* thường gặp trong lâm sàng: *M. avium* spp; *M. chelonae*; *M. abscessus*; *M. fortuitum*; *M. gordonae*; *M. intracellulare*; *M. scrofulaceum*; *M. interjectum*; *M. kansasii*; *M. malmoense*; *M. peregrinum*; *M. marinum*/*M. ulcerans*; *M. xenopi*

2. Nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật LPA (Line Probe Assay) để khuếch đại đoạn gene của chủng vi khuẩn NTB, sau đó lai với mẫu dò được thiết kế sẵn đặc hiệu cho từng loài *Mycobacterium*. Tùy theo đoạn gene của chủng NTM có trong bệnh phẩm lai đặc hiệu với mẫu dò nào thì sẽ xác định được tên của chủng NTB.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Tủ thao tác PCR có đèn tím
- Máy ly tâm an toàn (có nắp đậy từng cối) cho tuýp 50ml
- Máy ly tâm lạnh cho tuýp 1.5ml
- Máy ủ nhiệt khô/ướt
- Máy siêu âm (Ultrasonic)
- Máy PCR
- Lò vi sóng (Microwave Oven)
- Bộ điện di
- Máy lai GT Blot 20
- Tủ lạnh 4°C và tủ lạnh - 20°C
- Nồi hấp khử trùng
- Tủ sấy

- Máy vortex
- Pipette tự động các loại 10P, 20P, 1000P
- Panh, kẹp (Forceps)
- Máy ly tâm mini (Spin down)
- Đồng hồ hẹn giờ

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	GenoType Mycobacterium CM (thế hệ 1)	test	1,370
2	NALC	gam	0,450
3	Nước tinh sạch pha PCR mix	ml	0,700
4	NaOH	gam	0,650
5	Natri Citrat	gam	0,550
6	Thạch điện di	gam	0,100
7	TAE x50	ml	0,500
8	Ethidium Bromid	ml	0,050
9	Nước cất hai lần (ly tâm - Lai DNA)	ml	90,000
10	Tuýp Falcon 50 ml	tuýp	1,200
11	Đầu côn 10 µl	hộp	0,050
12	Đầu côn 100 µl	hộp	0,050
13	Đầu côn 1000 µl	hộp	0,070
14	Eppendorf 0,2 ml	cái	1,200
15	Eppendorf 1,5 ml	cái	2,400
16	Pipette nhựa 5 ml	cái	1,200
17	Pipette nhựa 20 ml	cái	1,000
18	Găng tay	đôi	1,000
19	Khẩu trang N95	cái	1,000
20	Khăn giấy	cuộn	0,020
21	Côn 70°	ml	20,000
22	Bút MARKER	cái	0,010
23	Bút chì kim 2B	cái	0,010
24	Băng dính trong	cuộn	0,010
25	Nhãn mã vạch	Cái	20,000
26	QC (nếu thực hiện) *		0,1
27	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Thực hiện xét nghiệm GenoType Mycobacterium CM với chủng vi khuẩn nuôi cấy lao lỏng/đặc.

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).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Xử lý mẫu bệnh phẩm

2.2. Tách chiết DNA

2.3. Phản ứng khuếch đại

2.4. Lai tự động trên máy GT-blot 20 hoặc GT48

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Vùng đối chứng liên hợp: CC: phải xuất hiện băng tín hiệu
- Vùng đối chứng cho họ Mycobacteria- UC: xuất hiện băng tín hiệu cho tất cả các mycobacteria và vi khuẩn Gram (+) có G+C cao
- Vùng đối chứng cho giống Mycobacterium: GC: xuất hiện băng khi có mặt các thành viên của giống mycobacterium
- Các vùng khác: đặc hiệu với các mẫu dò cho từng loài đã đề cập trong phần nguyên lí.

Trong trường hợp không định danh được chủng vi khuẩn với GenoType Mycobacterium CM, sử dụng GenoType Mycobacterium AS kit để có thể định danh các mycobacterium hiếm gặp hơn trong lâm sàng (sẽ được trình bày trong quy trình về GenoType Mycobacterium AS)

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Lỗi	Giải thích
Các băng tín hiệu đều yếu kể cả băng CC	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - Nhiệt độ phòng quá thấp hoặc hóa chất không được đưa về đến nhiệt độ phòng. - Nhiệt độ ủ quá thấp - Lượng CON-C và/hoặc SUB-C không đủ - Hóa chất hết hạn

Các băng tín hiệu đều yếu hoặc không có, trừ băng CC	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - PNM và HotstarTaq DNA Polymerase rã đông quá nhiều lần (tối ưu 5-6 lần) - PNM, HotstarTaq DNA Polymerase và các thành phần khác của Master Mix bị gia nhiệt. Sử dụng hộp giữ lạnh. - Nhiệt độ ủ quá cao hoặc quá thấp - Độ thuần, tinh sạch trong quá trình xử lý mẫu - Có chất ức chế trong quá trình tách DNA ảnh hưởng đến quá trình nhân gene. - Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên agarose 2%. Nếu không thấy có sản phẩm PCR thì lặp lại bước tách chiết DNA và PCR; Nếu xuất hiện băng mờ thì tăng lượng mẫu DNA từ 5ml thành 8ml; Nếu các băng sản phẩm PCR nhòe thì pha loãng lượng mẫu DNA.
Các băng được nhuộm mẫu không đều	- Thanh Strips không hoàn toàn ngập trong dung dịch lai - Lắc khay có vấn đề trong khi lai
Màu nền bị đậm	- Kiểm tra thiết bị, hóa chất, nhiệt độ. - CON-C và/hoặc SUB-C quá đậm đặc - Không đủ dung dịch rửa, bước rửa không sạch - Dung dịch rửa quá lạnh so với nhiệt độ phòng (25oC) - Phụ thuộc vào lượng DNA đem lai mà màu nền có thể đậm hơn. - Trong trường hợp này thì ngắt SUB-D ngay khi các băng tín hiệu đã nhìn rõ để tránh bị nhòe băng.
Các yếu tố khác ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm	- Nhiệt độ ủ sai - Dung dịch lai và nước rửa không được làm ấm và pha trộn trước khi thực hiện. - Nhiễm DNA trong bước tách chiết hoặc/và trong hóa chất sử dụng. Trong trường hợp các hóa chất PCR bị nhiễm thì mẫu đối chứng âm cũng xuất hiện băng. - Bị nhiễm bởi các giếng bên cạnh trong quá trình bổ sung dung dịch lai.

38. *Mycobacterium leprae* nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Kính hiển vi quang học
- Dụng cụ sấy lam (nếu có)
- Cán dao rạch da số 3 (Inox)

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	Lưỡi dao rạch da số 15	Cái	2,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Dầu soi kính	ml	1,000
4	Xylen lau kính	ml	1,000
5	Dung dịch fuchsin 1%	ml	5,000
6	Dung dịch cồn tẩy HCL 1%	ml	10,000
7	Dung dịch xanh methylen 0,2%	ml	5,000
8	Bông	Kg	0,001
9	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000

10	Đèn cồn	Cái	0,0001
11	Panh	Cái	0,0001
12	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
13	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
14	Mũ	Cái	0,020
15	Khẩu trang	Cái	0,200
16	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,0200
17	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,0010
18	Hộp đựng dung dịch khử khuẩn ngâm lưỡi dao		
19	Bút viết kính	Cái	0,020
20	Bút bi	Cái	0,010
21	Bật lửa	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,01
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,300
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
27	QC (nếu thực hiện) *		0,1
28	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Chất tiết và tế bào dưới da ở vị trí: dái tai, tổn thương

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 1 và Phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

2.2. Nhuộm Fuchsin

2.3. Tẩy màu bằng dung dịch cồn acid

2.4. Nhuộm nền bằng dung dịch xanh methylen

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

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

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ X TRÍ

1. Bệnh phẩm

Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm khi phát hiện bệnh phẩm lấy, vận chuyển, bảo quản không đúng qui định. Nếu lâm sàng vẫn yêu cầu, phòng xét nghiệm sẽ thông báo mức độ kém chính xác của kết quả xét nghiệm.

2. Kỹ thuật

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

39. *Mycobacterium leprae* PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt bộ gene của *Mycobacterium leprae* có trong bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

dựa trên nguyên lý kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 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 chạy PCR
- Các loại pipet điều chỉnh được: 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl
- Máy điện di
- Máy đọc ảnh gel
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu (-20°C)
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Dụng cụ lấy bệnh phẩm	Que	2,000

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
2	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Đôi	0,500
3	Ống nhựa Ependoff 1.5ml	ống	2,000
4	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
5	Hộp lưu bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Bộ KIT chiết tách DNA Đóng gói 50 phản ứng	Hộp	0,020
8	Khấu hao sinh phẩm cho chứng và QC kiểm tra lại, standard các loại	Test	1,350
9	PBS Buffer Đóng gói 500ml	Chai	0,002
10	Absolute Ethanol Đóng gói 1000ml	Chai	0,002
11	10mM dNTP mix Đóng gói 100 μ l	ống	0,005
12	Taq DNA Polymerase, Native Đóng gói: 5 units/ μ l, 500 units(100 μ l)	ống	0,002
13	Primer đặc hiệu cho vi khuẩn phong Đóng gói 50nM	bp	0,100
14	UltraPure DNase/RNase Distilled Water Đóng gói 500ml	Chai	0,001
15	Ultrapure Agarose Đóng gói 100g	Lọ	0,001
16	Ultrapure TBE Buffer 10X Đóng gói 1000ml	Chai	0,001
17	100bp DNA ladder Đóng gói 50ug	ống	0,001
18	10X BlueJuice Gel Loading dye Đóng gói 3x1ml	ống	0,001
19	Utrapure 10mg/ml Ethidium Bromide Đóng gói 10ml	lọ	0,001

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
20	Ống ly tâm 1,7ml Đóng gói 500c/túi	túi	0,004
21	ống PCR 0,2 ml, nắp phẳng Đóng gói: 500c/túi, 1000c/hộp	hộp	0,001
22	Đầu côn 1000ml có lọc	túi	0,001
23	Đầu côn 200ml có lọc	túi	0,004
24	Đầu côn 0,2-10 μ l có lọc	túi	0,001
25	Dung dịch khử trùng	ml	1,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
27	Giấy xét nghiệm	Tờ	1,000
28	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Giấy thấm	Cuộn	0,100
33	Bút viết kính, bút bi, diêm	Cái	0,020
34	Xà phòng	Bánh	0,010
35	Khăn lau tay	Cái	0,010
36	Bông, cotton	Túi	0,010
37	EQAS (nếu thực hiện)*		0,005

* 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

Các loại dịch tiết và mô sinh thiết

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 3).

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: có vạch sản phẩm PCR tương ứng với cặp mồi
- Phản ứng âm tính: không có vạch sản phẩm PCR tương ứng với cặp mồi

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Bệnh phẩm

Phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm khi phát hiện bệnh phẩm lấy, vận chuyển, bảo quản không đúng qui định. Nếu lâm sàng vẫn yêu cầu, phòng xét nghiệm sẽ thông báo mức độ kém chính xác của kết quả xét nghiệm.

2. Kỹ thuật

- 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

40. *Mycobacterium leprae* mảnh sinh thiết

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy chuyển
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy đúc
- Máy cắt
- Bể nhuộm
- Tủ ấm 56 độ
- 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	Số lượng
1	Formaldehyt	ml	30,000
2	Toluen	ml	50,000
3	Cồn tuyệt đối	ml	50,000
4	Paraplasts	gr	40,000
5	Cassett đúc bệnh phẩm	Cái	3,000
6	Dao cắt bệnh phẩm sử dụng 1 lần	Cái	1,000
7	Lam kính	Cái	3,000
8	Lamelle	Cái	3,000

9	Keo gắn Lamelle (Bom Canada)	ml	1,000
10	Thuốc nhuộm fucshin	ml	20,000
11	Thuốc nhuộm xanhmethylen	ml	20,000
12	Cồn Acid 1%	ml	20,000
13	Nước cất	ml	300,000
14	Gạc 30x30 (cm)	Cái	1,000
15	Bộ giá đựng tiêu bản	Cái	0,003
16	Mũ	Cái	0,200
17	Khẩu trang	Cái	0,200
18	Găng tay	đôi	1,000
19	Dung dịch rửa tay	ml	20,000
20	Bút bi	Cái	0,020
21	Giấy in A4	tờ	1,000

3. Bệnh phẩm

Mảnh sinh thiết tổ chức da.

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 1 và Phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Cố định bệnh phẩm trong formon

2.2. Chuyển đúc bệnh phẩm

2.3. Cắt bệnh phẩm

2.4. Nhuộm bệnh phẩm theo phương pháp nhuộm Ziehl - Neelsen

III. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

IV. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Trực khuẩn bị mất lớp mỡ do bước tẩy nên bằng xylen
- Khắc phục: phủ lại lam bằng dung dịch xylen với parafin tỷ lệ 1:1

41. *Vibrio cholerae* nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Nhận định sơ bộ hình ảnh vi khuẩn vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* trực tiếp từ bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

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

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang học
- 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	Số lượng
1	Lọ lấy bệnh phẩm	lọ	1,000
2	Que lấy bệnh phẩm	cái	1,000
3	Lam kính	cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Xylen lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm đỏ fuchsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 95 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Bông	kg	0,001

12	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
13	Đèn cồn	cái	0,0001
14	Panh	cái	0,0001
15	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,0001
16	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	cái	0,0001
17	Mũ	cái	0,020
18	Khẩu trang	cái	0,020
19	Găng tay	đôi	3,000
20	Găng tay xử lý dụng cụ	đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	bộ	0,001
22	Acid ngậm lam	ml	10,000
23	Ống nghiệm thủy tinh	ống	1,000
24	Bút viết kính	cái	0,020
25	Bút bi	cái	0,010
26	Bật lửa	cái	0,010
27	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	tờ	0,001
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
29	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
30	Khăn lau tay	cái	0,030
31	Giấy trả kết quả xét nghiệm	tờ	2,000
32	QC (nếu thực hiện) *		0,1
33	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Phân của người 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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

2.2. Nhuộm

- Nhuộm tím gentian trong vòng 60 giây
- Đổ toàn bộ phần thuốc nhuộm thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Hỗ trợ bắt màu tím bằng lugol trong vòng 30 giây
- Đổ toàn bộ phần lugol thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Tẩy màu bằng cồn 95% cho đến khi vừa hết màu tím phai ra
- Đổ toàn bộ phần cồn thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Nhuộm tương phản bằng fuchsin trong vòng 60 giây
- Đổ toàn bộ phần thuốc nhuộm thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Để tiêu bản khô và soi.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước của quy trình nhuộm Gram.
- Kiểm tra chất lượng thuốc nhuộm hàng tuần với chủng chuẩn.

42. *Vibrio cholerae* nhuộm huỳnh quang

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện nhanh *Vibrio cholerae* từ bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Nếu trong bệnh phẩm có *V. cholerae*, 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 phẩy khuẩn phát sáng màu vàng xanh.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 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	Số lượng
1	Lọ lấy bệnh phẩm	lọ	1,000
2	Que lấy bệnh phẩm	cái	1,000
3	Lam kính	cái	1,000
4	Nước muối sinh lý	ml	3,000
5	Thuốc nhuộm <i>Cholerae</i> DFA	ml	3,000
6	Bông	kg	0,001
7	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
8	Đèn cồn	cái	0,0001
9	Panh	cái	0,0001
10	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,0001
11	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	cái	0,0001

12	Mũ	cái	0,020
13	Khẩu trang	cái	0,020
14	Găng tay	đôi	3,000
15	Găng tay xử lý dụng cụ	đôi	0,020
16	Quần áo bảo hộ	bộ	0,001
17	Acid ngậm lam	ml	10,000
18	Ống nghiệm thủy tinh	ống	1,000
19	Bút viết kính	cái	0,020
20	Bút bi	cái	0,010
21	Bật lửa	cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	tờ	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	cái	0,030
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	tờ	2,000
27	QC (nếu thực hiện) *		0,1
28	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Phân của người 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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

2.2. Nhuộm *Cholerae* 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

Vibrio cholerae có hình ảnh phẩy 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.

43. *Vibrio cholerae* nuôi cấy, định danh và kháng thuốc

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện và định danh *V. cholerae* bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển.
Xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *V. cholerae*.

2. Nguyên lý

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

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *V. cholerae* được xác định bằng phương pháp kháng sinh đồ khoanh giấy khuếch tán và được phiên giải ra phân loại S, I, R dựa trên tái liệu hướng dẫn CLSI được cập nhật hàng năm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Kính hiển vi quang học
- Dụng cụ sấy lam (nếu có)
- Tủ ấm thường

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu bệnh phẩm/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Lọ lấy bệnh phẩm	lọ	1,000
2	Que lấy bệnh phẩm	cái	2,000
3	Lam kính	cái	4,000
4	Dầu soi kính	ml	2,000
5	Xylen lau kính	ml	2,000
6	Nước muối sinh lý	ml	15,000
7	Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin	ml	10,000
8	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	10,000
9	Cồn tẩy 95 độ	ml	20,000
10	Lugol	ml	10,000

11	Môi trường nuôi cấy	test	1,500
12	Bộ sinh vật hóa học API 20 NE	test	1,000
13	Kháng sinh đồ Muller - Hinton	đĩa	1,000
14	Khoanh giấy kháng sinh	khoanh	5,000
15	Tăm bông vô trùng	cái	1,000
16	Ống nghiệm thủy tinh	ống	1,000
17	Bông	kg	0,003
18	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	30,000
19	Đèn cồn	cái	0,0002
20	Panh	cái	0,0001
21	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,0001
22	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	cái	0,0001
23	Mũ	cái	0,060
24	Khẩu trang	cái	0,060
25	Găng tay	đôi	9,000
26	Găng tay xử lý dụng cụ	đôi	0,060
27	Quần áo bảo hộ	bộ	0,002
28	Acid ngậm lam	ml	20,000
29	Ống nghiệm thủy tinh	ống	1,000
30	Bút viết kính	cái	0,040
31	Bút bi	cái	0,020
32	Bật lửa	cái	0,020
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	tờ	0,001
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	6,000
37	Dung dịch nước rửa tay	ml	24,000
38	Khăn lau tay	cái	0,090
39	Giấy trả kết quả xét nghiệm	tờ	2,000
40	QC (nếu thực hiện) *		0,1
41	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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: Phân của người bệnh.

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

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nhuộm Gram và soi dưới kính hiển vi quang học

2.2. Nuôi cấy, định danh

- Nuôi cấy trên môi trường pepton kiềm, thạch kiềm và TCBS để ở điều kiện 37⁰C. Sau mỗi 6 giờ cấy chuyển vầng ở ống pepton kiềm sang môi trường thạch kiềm và TCBS. Khi nhìn thấy có khuẩn lạc nghi ngờ *V. cholera* mọc thì dùng không cấy chuyển nữa.
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ.
- Xác định tính chất sinh vật hóa học bằng kit API 20E.
- Ngưng kết với kháng huyết thanh đặc hiệu.

2.3. Kháng sinh đồ

Lựa chọn các khoanh giấy kháng sinh thử nghiệm cho *V. cholerae* theo hướng dẫn của CLSI để làm kháng sinh đồ bằng phương pháp khoanh giấy khuếch tán.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Định danh

- Hình thái học: *Vibrio cholerae* có hình ảnh phẩy khuẩn, bắt màu Gram âm (màu đỏ).
- Tính chất nuôi cấy: Nuôi cấy trên môi trường thạch kiềm (37⁰C), khuẩn lạc dạng S, trong như giọt sương; trên môi trường TCBS, khuẩn lạc dạng S, màu vàng. Trong môi trường pepton kiềm, vi khuẩn mọc nhanh, sau 6-8 h tạo thành vầng trên mặt môi trường.
- Một số tính chất sinh vật hóa học: lên men không sinh hơi đường glucose, saccharose, maltose, mannitol. Không lên men đường lactose, arabinose. Oxydase (+), indol (+), citrate simmons (+), LDC (+), ODC (+), ONPG (+). Urease (-), VP (±), ADH (-).

2. Phát hiện kháng thuốc

Đọc kháng sinh đồ và trả kết quả theo hướng dẫn của CLSI.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- *Vibrio cholerae* có thể bắt màu Gram dương do tẩy còn chưa đủ hoặc làm đồ phiên quá dày.
- *Vibrio cholerae* có thể không mọc do đốt ống quá nóng, điều kiện nuôi cấy không đảm bảo, lượng bệnh phẩm quá ít.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước của quy trình nhuộm Gram.
- Kiểm tra chất lượng thuốc nhuộm hàng tuần với chủng chuẩn.

Đề nghị ngưng trước khi tiến hành nuôi cấy.

44. *Vibrio cholerae* PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt gene đặc trưng của vi khuẩn *Vibrio cholera*

2. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật PCR, sử dụng cặp mồi có trình tự đặc hiệu.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001

7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1	ml	0,0001
14	Primer 2	ml	0,0001
15	Ependoff 1,7ml	Tube	3,000
16	Ependoff 0,2ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay	Đôi	0,100
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
36	Khăn lau tay	cái	0,010
37	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

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

Bệnh phẩm phân có thể lấy qua bờ, lấy bằng tăm bông trực tràng. Đặc điểm phân thường trắng như nước vo gạo, không màu, không mùi, rất hiếm khi có nhày, máu.

Dụng cụ lấy phân phải có nắp xoáy, tốt nhất là 2 lớp, bên ngoài có thêm một lớp bảo vệ để tránh lây nhiễm. Bệnh phẩm sau khi lấy phải gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt, nếu quá 2 tiếng phải bảo quản trong môi trường Cary – Blair.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA tổng số

2.2. Thực hiện PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Đánh giá 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 và có kích thước tương ứng so với thang DNA chuẩn.

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 xét nghiệm.

45. *Vibrio cholerae* giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định chính xác *Vibrio cholera*

2. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide dựa trên trình tự gen 16S RNA ribosome của vi khuẩn.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001

6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1	ml	0,0001
14	Primer 2	ml	0,0001
15	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
16	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay	Đôi	0,100
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
36	Khăn lau tay	cái	0,010
37	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

Bệnh phẩm phân hoặc chủng *Vibrio cholera* nuôi cấy thuần.

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

Bệnh phẩm phân có thể lấy qua bờ, lấy bằng tăm bông trực tràng. Đặc điểm phân thường trắng như nước vo gạo, không màu, không mùi, rất hiếm khi có nhày, máu.

Dụng cụ lấy phân phải có nắp xoáy, tốt nhất là 2 lớp, bên ngoài có thêm một lớp bảo vệ để tránh lây nhiễm. Bệnh phẩm sau khi lấy phải gửi ngay đến phòng xét nghiệm càng sớm càng tốt, nếu quá 2 tiếng phải bảo quản trong môi trường Cary – Blair.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA tổng số

2.2. Thực hiện PCR gen 16S ARN ribosome

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Giải trình tự gen

2.5. Kiểm tra độ tương đồng DNA

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 gen đích phải có độ tương đồng $\geq 95\%$ mới có thể kết luận được loài.

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 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.

46. *Neisseria gonorrhoeae* nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn phụ khoa
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Kính hiển vi quang 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	Số lượng
1	Lam kính	Cái	2,000
2	Dầu soi kính	ml	1,000
3	Xylen lau kính	ml	1,000
4	Dung dịch tím Gentian 1%	ml	5,000
5	Dung dịch Lugol 2%	ml	2,000
6	Dung dịch cồn tẩy Aceton 25%	ml	10,000
7	Dung dịch Fuchsin 1%	ml	5,000
8	Bông	Kg	0,001
9	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
10	Đèn cồn	Cái	0,0001
11	Panh	Cái	0,0001
12	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
13	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
14	Mũ	Cái	0,020

15	Mỏ vệt (to, vừa và nhỏ)	Cái	1,000
16	Thùng đựng dung dịch khử khuẩn ngâm mỏ vệt		
17	Khẩu trang	Cái	0,020
18	Găng tay	Đôi	3,000
19	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
20	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
21	Bút viết kính	Cái	0,020
22	Bút bi	Cái	0,010
23	Bật lửa	Cái	0,010
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
25	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
26	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
27	Khăn lau tay	Cái	0,030
28	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
29	QC (nếu thực hiện) *		0,1
30	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 tiết đường sinh dục, hậu môn, 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 1 và Phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị tiêu bản nhuộm
- Nhuộm tím gentian trong vòng 60 giây
- Đổ toàn bộ phần thuốc nhuộm thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Hỗ trợ bắt màu tím bằng lugol trong vòng 30 giây
- Đổ toàn bộ phần lugol thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy

- Tẩy màu bằng cồn aceton 25% cho đến khi vừa hết màu tím phai ra
- Đổ toàn bộ phần còn thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Nhuộm tương phản bằng fuchsin trong vòng 60 giây
- Đổ toàn bộ phần thuốc nhuộm thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Để tiêu bản khô và soi.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Vi khuẩn nhạt màu có thể do tẩy quá lâu hoặc nhuộm chưa đủ (thời gian).
- Nếu vi khuẩn tối màu có thể do tẩy chưa đủ thời gian.
- Mỗi mẻ nhuộm không nên quá nhiều tiêu bản, các tiêu bản để cách nhau ít nhất 1 cm.

47. *Neisseria gonorrhoeae* nuôi cấy, định danh và kháng thuốc

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện và định danh *V. cholerae* bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển.

Xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *V. cholerae*.

2. Nguyên lý

Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học.

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *N. gonorrhoeae* được xác định bằng phương pháp kháng sinh đồ khoanh giấy khuếch tán và được phiên giải ra phân loại S, I, R dựa trên tài liệu hướng dẫn CLSI được cập nhật hàng năm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2.
- Kính hiển vi quang học.
- Bàn phụ khoa.
- Đèn phụ khoa.
- Tủ ấm CO₂ 35 - 37°C.

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	Lam kính	Cái	2,000
2	Dầu soi kính	ml	1,000
3	Xylen lau kính	ml	1,000
4	Dung dịch tím Gentian 1%	ml	5,000
5	Dung dịch Lugol 2%	ml	2,000
6	Dung dịch cồn tẩy Aceton 25%	ml	10,000
7	Dung dịch Fuchsin 1%	ml	5,000

8	Que lấy bệnh phẩm hoặc tăm bông vô trùng	Cái	2,000
9	Mỏ vệt (to, vừa và nhỏ)	Cái	1,000
10	Pince dài 25 cm (thẳng hoặc cong)	Cái	1,000
11	Môi trường nuôi cấy (Thayer – Martin)	Đĩa	1,000
12	Môi trường làm kháng sinh đồ (Thayer – Martin)	Đĩa	2,000
13	Chủng chuẩn (Neisseria)		,000
14	Khoanh giấy tam kháng sinh làm KSD	Khoanh	12,000
15	Oxidase	Tube	1,000
16	Neisseria 4H	Thanh	1,000
17	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
18	Đèn cồn	Cái	0,0001
29	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
20	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
21	Mũ	Cái	0,020
22	Khẩu trang	Cái	0,020
23	Găng tay	Đôi	3,000
24	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
25	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
26	Thùng có dung dịch sát khuẩn ngâm mỏ vệt và Pince	ml	10,000
27	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
28	Bút viết kính	Cái	0,020
29	Bút bi	Cái	0,010
30	Bật lửa	Cái	0,010
31	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
32	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Khăn lau tay	Cái	0,030
35	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
36	QC (nếu thực hiện) *		0,1
37	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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, mủ: âm đạo, niệu đạo, họng, hậu môn...

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 1 và Phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nuôi cấy bệnh phẩm trên môi trường Thayer – Martin

2.2. Để vào tủ ẩm 35 – 36 độ có 5% - 10% CO₂, độ ẩm >80%

2.3. Chọn khuẩn lạc nghi ngờ

2.4. Phản ứng Oxidase (+)

2.5. Thử nghiệm tính chất sinh vật hóa học.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Định danh *Neisseria gonorrhoeae* dựa vào:

- Nhuộm Gram: cầu khuẩn Gram âm, xếp đôi, hình hạt cà phê nằm trong và ngoài tế bào
- Khuẩn lạc điển hình trên môi trường Thayer – Martin.
- Tính chất sinh vật hóa học: Oxidase dương tính; Lên men đường glucose.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Vi khuẩn không mọc do nồng độ CO₂ và độ ẩm không đủ tiêu chuẩn.
- Chất lượng môi trường Thayer – Martin không đủ tiêu chuẩn.

48. *Neisseria gonorrhoeae* PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt bộ gen của *Neisseria gonorrhoeae* (vi khuẩn lậu) có trong bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 tối thiểu cấp 1
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy vortex
- Máy chạy PCR
- Các loại pipet điều chỉnh được: 1000µl, 200µl, 100µl, 10µl
- Máy điện di
- Máy đọc ảnh gel
- 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)

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Giấy xét nghiệm	Tờ	1,000
2	Dụng cụ lấy bệnh phẩm	Que	2,000

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
3	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Đôi	0,500
4	Ống nhựa Ependoff 1.5ml	ống	2,000
5	Bút viết kính, bút bi, diêm	Cái	0,020
6	Xà phòng	Bánh	0,010
7	Khăn lau tay	Cái	0,010
8	Bông, cotton	Túi	0,010
9	Nước muối sinh lý	ml	5,000
10	Bộ KIT chiết tách DNA Đóng gói 50 phản ứng	Hộp	0,020
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chứng và QC kiểm tra lại, standard các loại	Test	1,350
12	PBS Buffer Đóng gói 500ml	Chai	0,002
13	Absolute Ethanol Đóng gói 1000ml	Chai	0,002
14	10mM dNTP mix Đóng gói 100µl	ống	0,005
15	Taq DNA Polymerase, Native Đóng gói: 5 units/µl, 500 units (100 µl)	ống	0,002
16	Primer đặc hiệu cho vi khuẩn <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Đóng gói 50nM	bp	0,100
17	UltraPure DNase/RNase Distilled Water Đóng gói 500ml	Chai	0,001
18	Ultrapur Agarose Đóng gói 100g	Lọ	0,001
19	Ultrapur TBE Buffer 10X Đóng gói 1000ml	Chai	0,001
20	100bp DNA ladder Đóng gói 50ug	ống	0,001
21	10X BlueJuice Gel Loading dye Đóng gói 3x1ml	ống	0,001
22	Utrapure 10mg/ml Ethidium Bromide Đóng gói 10ml	lọ	0,001
23	ống ly tâm 1,7ml Đóng gói 500c/túi	túi	0,004
24	ống PCR 0,2 ml, nắp phẳng Đóng gói: 500c/túi, 1000c/hộp	hộp	0,001
25	Đầu côn 1000ml có lọc	túi	0,001
26	Đầu côn 200ml có lọc	túi	0,004
27	Đầu côn 0,2-10µl có lọc	túi	0,001

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
28	Dung dịch khử trùng	ml	1,000
29	Số lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
30	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
31	Hộp lưu bệnh phẩm	Cái	0,0001
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Mũ	Cái	0,020
34	Khẩu trang	Cái	0,020
35	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
36	Giấy thấm	Cuộn	0,100
37	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: Các loại dịch tiết và mô sinh thiết

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 3).

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: có vạch sản phẩm PCR tương ứng với cặp mồi.
- Phản ứng âm tính: không có vạch sản phẩm PCR tương ứng với cặp mồi.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

2. Xử trí

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

49. *Neisseria gonorrhoeae* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện DNA đặc trưng của *Neisseria gonorrhoeae* từ các vết loét hoặc dịch đường sinh dục của người

2. Nguyên lý

Phát hiện DNA đặc trưng của *Neisseria gonorrhoeae* dựa trên nguyên lý của kỹ thuật real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Ví dụ cho loại sinh phẩm/ kỹ thuật hoặc tương đương (tùy quy trình cụ thể)

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Tăm bông vô trùng	Kg	0,001
2	Găng không có bột tal	Cái	0,500
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001

4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,200
7	Kit tách DNA	Test	2,200
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	ống Falcol 50ml	Cái	0,010
10	Ependoff 1,7ml	Tube	2,200
11	Ependoff 0,2ml	Tube	2,200
12	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	2,200
13	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
14	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
15	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Water-DEPC Treated	ml	1,000
22	Giấy thấm	Cuộn	0,100
23	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
25	Bút viết kính	Cái	0,020
26	Bút bi	Cái	0,010
27	Mũ	Cái	0,020
28	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
31	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
32	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
33	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
34	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
35	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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, dịch âm đạo, nước tiểu, dịch vết loét

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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm NGN rPCR Mix (VD)

2.1. Thu nhận và Xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết DNA

2.2. Tách chiết DNA: Tách chiết bằng hóa chất phenol/chloroform

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 Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube NGN rPCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “HEX” và “CY5” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM và màu HEX tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (đường biểu diễn dương tính) và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu CY5 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 FAM và màu HEX âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu CY5 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 36 trở về trước. Một mẫu có thể dương tính với 1 trong 2 tác nhân hoặc dương tính đồng thời cả 2 tác nhân.
- 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 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.

3. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân: Có thể mẫu âm thực sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

50. *Neisseria meningitidis* nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Kính hiển vi quang học
- Dụng cụ sấy lam (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu bệnh phẩm/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Lọ lấy bệnh phẩm	lọ	1,000
2	Que lấy bệnh phẩm	cái	1,000
3	Lam kính	cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Xylen lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm đỏ Fuchsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 95 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Bông	kg	0,001
12	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
13	Đèn cồn	cái	0,0001

14	Panh	cái	0,0001
15	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,0001
16	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	cái	0.0001
17	Mũ	cái	0,020
18	Khẩu trang	cái	0.020
19	Găng tay	đôi	3,000
20	Găng tay xử lý dụng cụ	đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	bộ	0,001
22	Acid ngậm lam	ml	10,000
23	Ống nghiệm thủy tinh	ống	1,000
24	Bút viết kính	cái	0,020
25	Bút bi	cái	0,010
26	Bật lửa	cái	0,010
27	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	tờ	0,001
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
29	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
30	Khăn lau tay	cái	0,030
31	Giấy trả kết quả xét nghiệm	tờ	2,000
32	QC (nếu thực hiện) *		0,1
33	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 não tủy, dịch ngoáy họng mũi, hồng ban trên da.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

2.2. Nhuộm Gram

- Nhuộm tím gentian trong vòng 60 giây

- Đổ toàn bộ phần thuốc nhuộm thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Hỗ trợ bắt màu tím bằng lugol trong vòng 30 giây
- Đổ toàn bộ phần lugol thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Tẩy màu bằng cồn 95% cho đến khi vừa hết màu tím phai ra
- Đổ toàn bộ phần cồn thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Nhuộm tương phản bằng safranin trong vòng 60 giây
- Đổ toàn bộ phần thuốc nhuộm thừa rồi rửa nhẹ tiêu bản dưới vòi nước chảy
- Để tiêu bản khô và soi.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước của quy trình nhuộm Gram.
- Kiểm tra chất lượng thuốc nhuộm hàng tuần với chủng chuẩn

51. *Neisseria meningitidis* nuôi cấy, định danh và kháng thuốc

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện và định danh *N. meningitidis* bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển.

Xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *N. meningitidis*.

2. Nguyên lý

Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học.

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *N. meningitidis* được xác định bằng phương pháp kháng sinh đồ khoanh giấy khuếch tán và được phiên giải ra phân loại S, I, R dựa trên tái liều hướng dẫn CLSI được cập nhật hàng năm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Kính hiển vi quang học
- Dụng cụ sấy lam (nếu có)
- Tủ âm CO₂ Advatage - Lab

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	Lọ lấy bệnh phẩm	lọ	1,000
2	Que lấy bệnh phẩm	cái	2,000
3	Lam kính	cái	4,000
4	Dầu soi kính	ml	2,000
5	Xylen lau kính	ml	2,000
6	Nước muối sinh lý	ml	15,000
7	Thuốc nhuộm đỏ fuchsin	ml	10,000
8	Thuốc nhuộm tím gentian	ml	10,000
9	Cồn tẩy 95 độ	ml	20,000

10	Lugol	ml	10,000
11	Môi trường nuôi cấy	test	1,500
12	Kháng sinh đồ sô cô la	đĩa	4,000
13	Khoanh giấy kháng sinh	khoanh	8,000
14	Dải giấy kháng sinh	cái	3,000
15	Tăm bông vô trùng	cái	1,000
16	Ống nghiệm thủy tinh	ống	1,000
17	Bông	kg	0,003
18	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	30,000
19	Đèn cồn	cái	0,0002
20	Panh	cái	0,0001
21	Khay đựng bệnh phẩm	cái	0,0001
22	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	cái	0,0001
23	Mũ	cái	0,060
24	Khẩu trang	cái	0,060
25	Găng tay	đôi	9,000
26	Găng tay xử lý dụng cụ	đôi	0,060
27	Quần áo bảo hộ	bộ	0,002
28	Acid ngậm lam	ml	20,000
29	Ống nghiệm thủy tinh	ống	1,000
30	Bút viết kính	cái	0,040
31	Bút bi	cái	0,020
32	Bật lửa	cái	0,020
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	tờ	0,001
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	6,000
35	Dung dịch nước rửa tay	ml	24,000
36	Khăn lau tay	cái	0,090
37	Giấy trả kết quả xét nghiệm	tờ	2,000
38	QC (nếu thực hiện) *		0,1
39	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 não tủy, dịch ngoáy họng mũi, tổn thương da.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục 1 và Phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nhuộm soi

2.2. Nuôi cấy

Nuôi cấy trên môi trường sô cô la để ở điều kiện 37°C/5% CO₂.

2.3. Định danh

Thử nghiệm tính chất sinh vật hóa học.

2.4. Kháng sinh đồ

Thử nghiệm các khoanh giấy kháng sinh và thanh Etest trên môi trường Muller-Hinton máu theo hướng dẫn của CLSI.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Neisseria meningitidis có hình ảnh song cầu, hình hạt cà phê, bắt màu Gram âm (màu đỏ).

Nuôi cấy trên môi trường sô cô la (37°C/5% CO₂), khuẩn lạc dạng S, xám.

Một số tính chất sinh vật hóa học: oxydase (+), glucose (+), maltose (+), lactose (-), saccharose (-).

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- *Neisseria meningitidis* có thể bắt màu không đúng do tẩy còn chưa đủ hoặc làm đồ phiên quá dày.
- *Neisseria meningitidis* có thể không mọc do đốt ống quá nóng, điều kiện nuôi cấy không đảm bảo, lượng bệnh phẩm quá ít.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước của quy trình nhuộm Gram.
- Kiểm tra chất lượng thuốc nhuộm hàng tuần với chủng chuẩn.
- Để ống nguội trước khi tiến hành nuôi cấy; thường xuyên kiểm tra nhiệt độ, nồng độ CO₂ cho nuôi cấy.

52. *Neisseria meningitidis* PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của *Neisseria meningitidis* (não mô cầu)

2. Nguyên lý

Thực hiện bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Côn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000

8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1	ml	0,0001
14	Primer 2	ml	0,0001
15	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
16	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay	Đôi	0,100
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
36	Khăn lau tay	cái	0,010
37	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

Máu, dịch ngoáy họng, 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

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục 3)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA tổng số

2.2. Thực hiện PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Đánh giá 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 và có kích thước phù hợp tương ứng với thang DNA chuẩn.

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 xét nghiệm.

53. *Neisseria meningitidis* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện DNA đặc trưng của *Neisseria meningitidis* từ dịch não tủy.

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy realtime PCR và hệ thống máy vi tính
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2 °C - 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C) hoặc (-70°C)
- Micropipettes các thể tích từ 5-1000µl

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 03 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Tăm bông vô trùng	kg	0,001
2	Găng không bột tal	cái	0,500
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,200

7	Kit tách chiết DNA	Test	2,200
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Ống Falcol 50 ml	Cái	0,010
10	Eppendorf 1,7 ml	Tube	2,200
11	Eppendorf 0,2 ml	Tube	2,200
12	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
13	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
14	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
15	Đầu côn 1ml có lọc	Cái	3,200
16	Water-DEPC treated	ml	1,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
25	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
26	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
27	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
28	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
29	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 3)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm NHS Meningitidis Real-TM (Sacace -VD)

2.1. Thu nhận và xử lý mẫu

2.2. Tách chiết DNA

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay đá lạnh hoặc đá đang tan.
- PCR 0.2 ml.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR 0.2 ml cần. Chuẩn bị MasterMix và phân phối vào các tube sau đó ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho các chứng dương, chứng âm và IC (internal control) hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube PCR mix. Xong đặt các tube vào máy realtime PCR
- Khởi động máy realtime PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “JOE” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy realtime PCR hoạt động.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính.
- Cho máy realtime 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 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

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân: Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.
- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

54. *Chlamydia* test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nhanh *Chlamydia* có trong bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng lại lipopolysacchride (LPS) của vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* để phát hiện sự có mặt của *Chlamydia trachomatis* trong bệnh phẩm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn phụ khoa
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- 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	Số lượng
1	Bộ Kit làm xét nghiệm	test	1,000
2	Micropipette 50 – 200 µl	cái	1,000
3	Đầu côn 200 µl	cái	3,000
4	Bông	Kg	0,001
5	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
6	Đèn cồn	Cái	1,000
7	Panh	Cái	1,000
8	Mỏ vệt (to, vừa và nhỏ)	Cái	1,000
9	Thùng đựng dung dịch khử khuẩn ngâm mỏ vệt		
10	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
11	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	1,000

12	Mũ	Cái	1,000
13	Khẩu trang	Cái	1,000
14	Găng tay	Đôi	2,000
15	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	2,000
16	Quần áo bảo hộ	Bộ	1,000
17	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
18	Bút viết kính	Cái	1,000
19	Bút bi	Cái	1,000
20	Bật lửa	Cái	1,000
21	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	1,000
22	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
23	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
24	Khăn lau tay	Cái	1,000
25	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Dịch, mủ âm đạo, mủ niệu đạo

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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Bỏ thanh thử ra khỏi túi bảo quản

2.2. Xoay tăm bông bệnh phẩm trong lọ, tách chiết tế bào 3 - 4 lần, bỏ tăm bông ra

2.3. Sử dụng micropipette hút 150 μ l dung dịch bệnh phẩm nhỏ vào thanh thử.

2.4. Để thanh thử ở nhiệt độ phòng. Đọc kết quả sau 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	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: Bệnh phẩm chưa cho vào dung dịch tách chiết tế bào có thể giữ ở nhiệt độ phòng 24h và 72h ở tủ lạnh 2 - 8 độ C

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Dịch nhầy ở niệu đạo (nam giới) và ở cổ tử cung (nữ giới) cần được lau sạch để tránh cho kết quả dương tính giả.
- Bệnh phẩm để trong ống nghiệm khô có thể bảo quản trong tủ lạnh (2-8⁰ C) lâu nhất là 72h. Không được bảo quản trong ngăn đá.
- Phải làm lại mẫu xét nghiệm mới khi thanh thử bị hỏng (thanh thử không xuất hiện vạch tím tại vạch C).

55. *Chlamydia* nhuộm huỳnh quang

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện nhanh sự có mặt của *Chlamydia* trong bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Phát hiện các tiểu thể *Chlamydia* có trong bệnh phẩm bằng phương pháp nhuộm soi trên kính hiển vi huỳnh quang, các tiểu thể *Chlamydia* được phát sáng trên nền tối.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Kính hiển vi huỳnh quang đèn LED
- Thiết bị 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	Số lượng
1	FAST Auramin O stain	ml	1,300
2	FAST Decolorizer	ml	1,200
3	Cồn 96 độ (vệ sinh dụng cụ và ngâm lam)	ml	20,000
4	Dung dịch khử khuẩn ngâm que phết đờm	ml	15,000
5	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
6	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
7	Lọ/cốc/ tuýp lấy bệnh phẩm	Lọ	1,200
8	Lam kính	Cái	1,500
9	Lam kính (kiểm chuẩn)	Cái	0,200

10	Que phết đờm	Cái	1,500
11	Giấy lau kính	Tờ	2,000
12	Bông	Kg	0,001
13	Panh	Cái	0,0001
14	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
15	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
16	Hộp lưu tiêu bản	Cái	0,0001
17	Bô can (bình chứa) vật nhiễm	Cái	0,0001
18	Mũ	Cái	0,020
19	Khẩu trang	Cái	0,020
20	Găng tay	Đôi	2,000
21	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
22	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
23	Khăn lau tay	Cái	0,030
24	Túi chứa rác thải lây nhiễm	Cái	0,0001
25	Khăn giấy vệ sinh các bàn làm việc	Tờ	2,000
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Sổ nhận bệnh phẩm	Tờ	0,001
29	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
30	Sổ bàn giao kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
31	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
32	Nhãn mã vạch	Cái	3,000
33	QC (nếu thực hiện) *		0,1
34	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 niệu đạo, dịch cổ tử cung, các loại dịch khác. ...

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục 1 và Phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

2.2. Cố định tiêu bản

2.3. Nhuộm màu bằng FAST Auramin O

2.4. Tẩy và nhuộm nền bằng FAST Decolorizer

2.5. Đọc và đánh giá kết quả trên kính hiển vi huỳnh quang đèn LED

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Quan sát các tiêu thể *Chlamydia trachomatis* bằng vật kính 40 trên kính huỳnh quang đèn LED. Các tiêu thể *Chlamydia trachomatis* có hình tròn, bầu dục, riêng lẻ hoặc từng đám. tiêu thể bắt màu vàng sáng phát quang trên nền tối. Đếm số lượng tiêu thể và ghi kết quả như bảng sau:

Số lượng tiêu thể	Kết quả	Mức độ
> 50 tiêu thể/ 1 vi trường (Đọc ít nhất 8 vi trường)	Dương tính	3 +
5-50 tiêu thể/ 1 vi trường (Đọc ít nhất 20 vi trường)	Dương tính	2+
20-199 tiêu thể/ 1 dòng (Đọc ít nhất 1 dòng)	Dương tính	1 +
1-19 tiêu thể/ 1 dòng	Dương tính	Ghi số lượng cụ thể
0 tiêu thể/ ít nhất 1 dòng	Âm tính	

Lưu ý: 1 dòng lam tương đương 40 vi trường.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Mỗi mẻ nhuộm không nên quá 12 tiêu bản, các tiêu bản để cách nhau ít nhất 1 cm.
- Tiêu thể phát quang yếu có thể do tiêu bản sau khi nhuộm không đọc ngay, tiêu bản bị tiếp xúc nhiều với ánh sáng.
- Tiêu thể phát quang yếu có thể do chất lượng hóa chất không đạt do bảo quản chưa đúng, quá hạn.

56. *Chlamydia* Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể (Ab) kháng *Chlamydia*

2. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) gián tiếp (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

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

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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
21	Mũ	Cái	0,020
22	Khẩu trang	Cái	0,020
23	Găng tay	Đôi	0,100
24	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
25	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
26	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
27	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
28	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
29	Khăn lau tay	Cái	0,010
30	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 được ví dụ ở trên.

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (Xem Phụ lục 2).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Platelia™ Chlamydia IgG TMB - BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Chlamydia IgG
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	Rửa các giếng 1 lần bằng dung dịch rửa đã pha loãng.
7	Cho chứng và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của qui trình.
8	Đậy tấm và ủ.
9	Rửa phiến nhựa.
10	Chuẩn bị chất cộng hợp
11	Đậy tấm và ủ
12	Rửa phiến nhựa
13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ phiến nhựa, không đậy tấm và tránh ánh sáng
15	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
16	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- OD chứng âm < 0,175.
- OD cut-off > 0,175.
- OD chứng dương > 0,5
- OD cut-off/OD chứng âm > 1,3
- OD chứng dương/OD cut-off > 2

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

3. Tính giá trị ngưỡng

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

3. Diễn giải kết quả

- Dương tính: nếu OD bệnh phẩm $\geq$ CO
- Nghi ngờ: nếu $CO \times 0,8 \leq OD \text{ bệnh phẩm} < CO$
- Âm tính: nếu $OD \text{ bệnh phẩm} < CO \times 0,8$

Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ 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.
- Dung dịch cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy 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.

57. *Chlamydia* PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt bộ gen của vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* có trong bệnh phẩm

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 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 chạy PCR
- Các loại Micropipette điều chỉnh được: 1000µl, 200µl, 100µl, 10µl
- 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)

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Giấy xét nghiệm	Tờ	1,000

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
2	Dụng cụ lấy bệnh phẩm	Que	2,000
3	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Đôi	0,500
4	Ống nhựa Ependoff 1.5ml	ống	2,000
5	Bút viết kính, bút bi, diêm	Cái	0,020
6	Xà phòng	Bánh	0,010
7	Khăn lau tay	Cái	0,010
8	Bông, cotton	Túi	0,010
9	Nước muối sinh lý	ml	5,000
10	Bộ KIT chiết tách DNA Đóng gói 50 phản ứng	Hộp	0,020
11	Khấu hao sinh phẩm cho chứng và QC kiểm tra lại, standard các loại	Test	1,350
12	PBS Buffer Đóng gói 500ml	Chai	0,002
13	Absolute Ethanol Đóng gói 1000ml	Chai	0,002
14	10mM dNTP mix Đóng gói 100µl	ống	0,005
15	Taq DNA Polymerase, Native Đóng gói: 5 units/µl, 500 units(100 µl)	ống	0,002
16	Primer đặc hiệu cho vi khuẩn Chlamydia trachomatis Đóng gói 50nM	bp	0,100
17	UltraPure DNase/RNase Distilled Water Đóng gói 500ml	Chai	0,001
18	Ultrapure Agarose Đóng gói 100g	Lọ	0,001
19	Ultrapure TBE Buffer 10X Đóng gói 1000ml	Chai	0,001
20	100bp DNA ladder Đóng gói 50ug	ống	0,001

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
21	10X BlueJuice Gel Loading dye Đóng gói 3x1ml	ống	0,001
22	Utrapure 10mg/ml Ethidium Bromide Đóng gói 10ml	lọ	0,001
23	ống ly tâm 1,7ml Đóng gói 500c/túi	túi	0,004
24	ống PCR 0,2 ml, nắp phẳng Đóng gói: 500c/túi, 1000c/hộp	hộp	0,001
25	Đầu côn 1000ml có lọc	túi	0,001
26	Đầu côn 200ml có lọc	túi	0,004
27	Đầu côn 0,2-10 μ l có lọc	túi	0,001
28	Dung dịch khử trùng	ml	1,000
29	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
30	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
31	Hộp lưu bệnh phẩm	Cái	0,0001
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Mũ	Cái	0,020
34	Khẩu trang	Cái	0,020
35	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
36	Giấy thấm	Cuộn	0,100
37	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

Các loại dịch tiết và mô sinh thiết

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 3).

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 nếu có vạch sản phẩm PCR tương ứng với cặp môi
- Phản ứng âm tính nếu không có vạch sản phẩm PCR tương ứng với cặp môi

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.

58. *Chlamydia* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định DNA đặc trưng của *Chlamydia*

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰ C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Tăm bông vô trùng	Kg	0,001
2	Găng không có bột tal (DNase-RNase free)	Cái	0,001
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,200

7	Kit tách DNA	Test	2,200
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	ống Falcol 50ml	Cái	0,010
10	Ependoff 1,7ml	Tube	2,200
11	Ependoff 0,2ml	Tube	2,200
12	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	2,200
13	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
14	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
15	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Water-DEPC Treated	ml	1,000
22	Giấy thấm	Cuộn	0,100
23	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
25	Bút viết kính	Cái	0,020
26	Bút bi	Cái	0,010
27	Mũ	Cái	0,020
28	Khẩu trang	Cái	0,020
29	Găng tay	Đôi	0,100
30	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
31	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
32	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
33	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
34	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
35	Khăn lau tay	Cái	0,010
36	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

Dịch niệu đạo, dịch âm đạo, nước tiểu, dịch vết loét

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

Bộ sinh phẩm CHT rPCR Mix (VD)

2.1. Thu nhận và Xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết DNA

2.2. Tách chiết DNA: Tách chiết bằng hóa chất phenol/chloroform

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 Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube CHT rPCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Bật máy real-time PCR. Bật máy tính và chờ cho máy tính khởi động xong, gọi chương trình real-time PCR lên.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “HEX” và “CY5” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM và màu HEX tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (đường biểu diễn dương tính) và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu CY5 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 FAM và màu HEX âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu CY5 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 36 trở về trước. Một mẫu có thể dương tính với 1 trong 2 tác nhân hoặc dương tính đồng thời cả 2 tác nhân.
- 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 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.

3. In đồ thị kết quả

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.

59. *Chlamydia* Real-time PCR hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định DNA đặc trưng của *Chlamydia trachomatis*

2. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật Real-time PCR trên hệ thống tự động.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy tách chiết tự động, máy khuếch đại và phát hiện tự động
- Hệ thống máy tính
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Pipette nhựa 1-3ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 22 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Lọ vô trùng	Cái	1,000
2	Bộ lấy mẫu và xử lý bệnh phẩm	Cái	1,000
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,100
7	Control (chứng dương+chứng âm)	Test	0,050
8	Control Diluent	Test	0,050
9	Kít tách DNA	Test	1.100

10	Kít tách DNA 2	Test	1,100
11	Elution plate	Cái	0,050
12	Extraction plate	Cái	0,050
13	Máng đựng hóa chất to 200ml	Cái	0,050
14	Máng đựng hóa chất nhỏ 50 ml	Cái	0,100
15	Tip CORE TIPS w. Filter 1ml	Cái	10,000
16	Giấy thấm	Cuộn	0,100
17	Giấy xét nghiệm	Tờ	3,000
18	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
19	Bút viết kính	Cái	0,020
20	Bút bi	Cái	0,010
21	Mũ	Cái	0,020
22	Khẩu trang	Cái	0,020
23	Găng không có bột tal	Đôi	0,500
24	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
25	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
26	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
27	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
28	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
29	Khăn lau tay	Cái	0,010
30	EQAS (nếu thực hiện)*		0,020

* 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 cổ tử cung, dịch âm đạo, nước tiểu, dịch niệu đạo

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: Cobas 4800 CT/NG test - Roche (VD)

2.1. Thu nhận và Xử lý mẫu

Bệnh phẩm lấy xong phải cho vào ống xử lý mẫu trong vòng 24 giờ.

2.2. Tách chiết DNA

Thực hiện tách chiết DNA tự động.

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

Khuyếch đại DNA real-time - PCR, đọc kết quả bằng máy tự động

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng âm: Valid (Có giá trị)
- Chứng dương: Valid (Có giá trị)

* Không nhận các kết quả của chứng không có giá trị khi xuất hiện thông báo lỗi:

- Chứng âm: Invalid (Không có giá trị)
- Chứng dương: Invalid (Không có giá trị)

2. Phân tích kết quả

Khi chọn subtest CT	Diễn giải kết quả
CT POS	Mẫu dương tính với <i>Chlamydia</i>
CT NEG	Mẫu âm tính với <i>Chlamydia</i>
CT invalid	Không ra kết quả, cần chạy lại mẫu
Failed	Bị lỗi, cần xem chi tiết báo cờ để tìm ra nguyên nhân. Sau đó chạy lại mẫu.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Việc lấy mẫu, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Khuyến cáo: Nhịn tiểu ít nhất 2giờ, lấy tia đầu tiên.

60. *Clostridium* nuôi cấy, định danh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện và định danh vi khuẩn *Clostridium* bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển.

2. Nguyên lý

Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Hệ thống máy nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Dầu soi kính	ml	1,000
4	Xylen lau kính	ml	1,000
5	Nước muối sinh lý	ml	5,000
6	Thuốc nhuộm đỏ fuchsin	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm tím gentian	ml	5,000
8	Cồn tẩy 95 độ	ml	10,000
9	Lugol	ml	5,000
10	Thuốc nhuộm xanh methylen	ml	5,000

11	Môi trường nuôi cấy kỵ khí	chai	1,000
12	Môi trường thạch máu thường	Đĩa	2,000
13	Môi trường thạch máu kỵ khí	Đĩa	2,000
14	Bộ giá đường API	Test	1,000
15	Bình khí trộn (tính theo giờ)	Giờ	168,000
16	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
17	Bông	Kg	0,001
18	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
19	Đèn cồn	Cái	0,0001
20	Panh	Cái	0,0001
21	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
22	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
23	Mũ	Cái	0,020
24	Khẩu trang	Cái	0,020
25	Găng tay	Đôi	3,000
26	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
27	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
28	Acid ngậm lam	ml	10,000
29	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
30	Bút viết kính	Cái	0,020
31	Bút bi	Cái	0,010
32	Bật lửa	Cái	0,010
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
36	Khăn lau tay	Cái	0,030
37	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
38	QC (nếu thực hiện) *		0,1
39	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 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 1 và Phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nhuộm soi bệnh phẩm, đánh giá sơ bộ

2.2. Nuôi cấy bệnh phẩm vào môi trường phân lập

2.3. Ủ ấm qua đêm

2.4. Nhận định khuẩn lạc

2.5. Nhuộm soi, thử nghiệm các thử nghiệm sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng các bộ sinh vật hóa học chuyên dụng.

Tất cả các bước tiến hành và ủ ấm đều được thực hiện bên trong hệ thống máy nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí nhằm đảm bảo điều kiện môi trường nuôi cấy.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dương tính: Phân lập và định danh được *C. difficile*.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được *Clostridium*.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Kết quả âm tính không có nghĩa là không có *C. difficile* trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy *C. difficile*.

Tất cả các thao tác kỹ thuật phải diễn ra bên trong hệ thống máy để đảm bảo điều kiện môi trường nuôi cấy kỵ khí.

Môi trường kỵ khí sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn phải đảm bảo đúng nồng độ.

61. *Clostridium difficile* miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện độc tố A và 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).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELFA.
- Máy ly tốc độ > 12000 gpm/phút
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Micropipette 100 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống tube eppendorf

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	Khấu 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	EQAS (nếu thực hiện)*		0,005

14	Nước cất	ml	8,000
15	Đầu cân 1000 µl	Cái	2,000
16	Đầu cân 200 µl	Cái	6,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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: 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).

2. Tiến hành kỹ thuật:

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

Các bước tiến hành	Xét nghiệm định tính
1	Chuẩn bị sinh phẩm
2	Chuẩn bị mẫu phân Chuẩn bị standards và các chứng
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm theo thứ tự hướng dẫn
4	Đưa kit 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 chúng phải nằm trong khoảng giới hạn chấp nhận.

2. Nhận định, trả lời kết quả

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

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

- Mẫu phân của trẻ dưới 2 tuổi: VIDAS test có thể bị ảnh hưởng bởi Meconium nên không thực hiện trên mẫu phân của trẻ dưới 2 tuổi.
- Phân chứa quá nhiều lượng chất béo: Không thực hiện trên mẫu phân chứa quá nhiều lượng chất béo.
- Trộn mẫu phân không đều: Lấy lại bệnh phẩm và xét nghiệm lại.
- Kết quả xét nghiệm dương tính dùng để chẩn đoán viêm đại tràng hoặc tiêu chảy do *C. Difficile*: Không dựa vào một mình kết quả xét nghiệm mà phải phối hợp với dấu hiệu lâm sàng và tiền sử bệnh khi chẩn đoán bệnh có liên quan đến *C. difficile*.

62. *Clostridium difficile* PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen mã hóa cho 2 loại độc chất A và B của vi khuẩn *Clostridium difficile* từ mẫu phân.

2. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật PCR sử dụng bộ kit *C. difficile* A/B (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Tủ lạnh 2^oC -8^oC
- Tủ âm sâu (-20^o C) hoặc (-70^oC) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	<i>C. difficile</i> A/B kit (VD)	Test	1,000
2	Nước cất	ml	0,500
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,100
4	Tube ly tâm 1.5 ml	Tube	2,000
5	PRC tube thể tích 200 µl	Tube	1,000
6	Đầu côn có lọc 1000 µl	cái	6,000
7	Đầu côn có lọc 200 µl	cái	12,000
8	Đầu côn có lọc 10 µl	cái	6,000

9	Micropipette 2-20 µl	cái	0,010
10	Micropipette 10-100 µl	cái	0,010
11	Micropipette 100-1000 µl	cái	0,010
12	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
13	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	20,000
14	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
15	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
16	Khăn lau tay	Cái	0,030
17	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
18	Bông	kg	0,010
19	Giấy y tế	Tờ	2,000
20	Giá đỡ PCR tube	Cái	0,001
21	Kẹp nhựa, marker	Cái	0,001
22	Tube Eppendorf	Cái	2,000
23	Tube đặt phản ứng	Cái	2,000
24	Khẩu trang	Cái	1,000
25	Găng tay không bột tal	Đôi	2,000
26	Quần áo bảo hộ	Cái	1,000
27	Mũ	Cái	1,000
28	QC (nếu thực hiện) *		0,100
29	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

- Thu thập các mẫu phân vào các ống chứa kín, không cần chất bảo quản.
- Mẫu phải được bảo quản ở 2-8°C và làm xét nghiệm ngay lập tức hoặc giới hạn trong 24 giờ. Trong trường hợp khác, mẫu phải được đông lạnh ngay lập tức và được trữ lên tới 10 ngày ở nhiệt độ -20°C hoặc lạnh hơn. Sự rã đông không được ảnh hưởng đến kết quả.

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 3).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị mẫu

2.2. Tách chiết DNA

2.3. Cài đặt máy luân nhiệt

2.4. Chuẩn bị cho PCR mix

2.5. Chạy phản ứng PCR

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

FAM	HEX	Kết quả
Ct > 0	Không liên quan (Ct > 0)	Dương tính
Ct = 0	Ct > 0	Âm tính
Ct = 0	Ct = 0	Bị ức chế

Kết quả chỉ có giá trị nếu:

- Mẫu blank phải dương tính ở kênh **HEX**, nhưng âm tính ở kênh **FAM**
- Chứng dương phải dương tính ở kênh **FAM**

Nếu 2 điều kiện gặp nhau, kết quả có giá trị và có khả năng phân tích kết quả. Ngoài ra các kết quả khác đều không có giá trị

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Vấn đề 1: Không tín hiệu

- Sai kênh được chọn
- Hút sai dẫn tới bỏ quên 1 số thuốc thử hoặc mẫu
- Tác động ức chế của mẫu: DNA không đủ lượng hoặc không đủ độ tinh sạch
- Kiểm tra bộ kit được bảo quản đúng
- Kiểm tra hoạt động của máy luân nhiệt

Vấn đề 2: Mật độ huỳnh quang quá thấp

- Hư thuốc nhuộm và/hoặc primers trong thuốc thử do điều kiện bảo quản không phù hợp
- Lượng mẫu và/hoặc độ tinh sạch thấp của DNA

Vấn đề 3: Mật độ huỳnh quang thay đổi

- Master mix không được phối trộn tốt
- Bọt khí có trong ống PCR

63. *Leptospira* test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt của *Leptospira* IgM trong mẫu huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Sử dụng kháng nguyên có nguồn gốc từ *Leptospira* để phát hiện mặt của *Leptospira* IgM trong mẫu huyết thanh

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Micropipet
- Đồng hồ bấm giây
- Máy ly tâm thường

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	Ống lấy bệnh phẩm	ống	1,000
2	Bơm tiêm	cái	1,000
3	Bông	Kg	0,001
4	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
5	Panh	Cái	0,0001
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Hóa chất chính	test	1,000
9	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	test	0,300
10	Đầu côn vàng	Cái	2,000
11	Acid ngâm rửa	ml	10,000
12	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
13	Mũ	Cái	0,020

14	Khẩu trang	Cái	0,020
15	Găng tay	Đôi	2,000
16	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
17	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
18	Bút viết kính	Cái	0,020
19	Bút bi	Cái	0,010
20	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
21	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Khăn lau tay	Cái	0,010
24	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm: Mẫu 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).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm SD Bioline Leptospira IgG/IgM (Hàn Quốc)

2.1. Ly tâm ống bệnh phẩm

2.2. Bóc vỏ thanh xét nghiệm, ghi mã bệnh phẩm tương ứng

2.3. Nhỏ huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm

2.4. Nhỏ dung dịch pha loãng vào vùng nhỏ pha loãng theo hướng dẫn

2.5. Đọc kết quả sau 15 – 20 phút

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Kết quả được chấp nhận khi xuất hiện màu rõ ràng, sắc nét ở vạch chứng C
 - + Dương tính khi xuất hiện màu ở vạch C và vạch T.
 - + Âm tính khi xuất hiện màu ở vạch chứng C và không xuất hiện màu ở các vạch còn lại.
- Không có giá trị: vạch chứng C không xuất hiện sau 15-10 phút thì cần kiểm tra lại hóa chất, các bước thực hiện, làm lại test khác.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Đọc kết quả trước 15-20 phút hoặc sau 30 phút có thể làm sai lệch kết quả.
- Cho quá ít bệnh phẩm, hay quá nhiều dung dịch pha loãng có thể làm ảnh hưởng đến nhận định kết quả.
 - Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

64. *Mycoplasma pneumoniae* Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định DNA đặc trưng của *Mycoplasma pneumoniae*.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰ C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Lọ vô trùng	Cái	1,000
2	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
3	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	2,000
6	Kit tách DNA	Test	3,000
7	EQAS (nếu thực hiện)*		0,005
8	Ống Falcon 50ml	Cái	1,000
9	Ependoff 1,7ml	Tube	6,000

10	Ependoff 0,2ml	Tube	3,000
11	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	3,000
12	Đầu côn 30 µl	Cái	3,000
13	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	3,000
14	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	7,000
15	Giấy thấm	Cuộn	0,100
16	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
17	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
18	Bút viết kính	Cái	0,020
19	Bút bi	Cái	0,010
20	Mũ	Cái	0,020
21	Khẩu trang	Cái	0,020
22	Găng không có bột tal	Đôi	0,100
23	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
24	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
25	Dung dịch nước 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	EQAS (nếu thực hiện)*		0,005

* 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

Đờm, dịch phế quản, dịch tỵ hầu.

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

Bộ sinh phẩm Mycoplasma pneumonia PCR Kit - Gene Proof (VD)

2.1. Thu nhận và Xử lý mẫu

Phải đồng nhất và xử lý mẫu trước khi tách chiết DNA

2.2. Tách chiết DNA

2.3. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Lấy đủ số tube 0,2 ml cần dùng.
- Thực hiện bước này với mastermix và các tube phản ứng được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Phân phối MasterMix vào mỗi tube.
- Cho chúng [+], chúng [-] hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube MasterMix.
- Ly tâm nhẹ cho dịch nằm hết dưới đáy tube. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “JOE” cho mẫu, chúng dương và chúng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu JOE dương tính hoặc âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM và màu âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu JOE 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 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 hoặc thực hiện lại xét nghiệm sau 1-3 tháng.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chúng nội phải dương tính.

3. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có mẫu và chúng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân: Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.
- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

65. *Mycoplasma hominis* nuôi cấy, định danh và kháng thuốc

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện và định danh *M. hominis* bằng phương pháp nuôi cấy.

Xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *M. hominis*.

2. Nguyên lý

Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa.

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *M. hominis* được xác định bằng phương pháp cấy trong canh thang đã có sẵn lượng kháng sinh nhất định. Đánh giá mức độ nhạy cảm với kháng sinh tùy theo khả năng mọc của vi khuẩn trong môi trường có chứa kháng sinh.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 ấm CO₂
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Bàn phụ khoa
- Đèn phụ khoa
- 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	Số lượng
1	Que lấy bệnh phẩm hoặc tăm bông vô trùng	Cái	2,000
2	Mỏ vệt (to, vừa và nhỏ)	Cái	1,000
3	Môi trường A7	Đĩa	1,000
4	Môi trường DUO KIT	Bộ	1,000
5	Bông	Kg	0,001
6	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
7	Đèn cồn	Cái	0,0001
8	Panh	Cái	0,0001

9	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
11	Mũ	Cái	0,020
12	Khẩu trang	Cái	0,020
13	Găng tay	Đôi	3,000
14	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
15	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
16	Hộp đựng dung dịch khử khuẩn ngâm mổ vệt	ml	10,000
17	Bút viết kính	Cái	0,020
18	Bút bi	Cái	0,010
19	Bật lửa	Cái	0,010
20	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
21	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Khăn lau tay	Cái	0,030
24	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
25	QC (nếu thực hiện) *		0,1
26	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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, mủ: dịch cổ tử cung, niệu đạo...

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 1 và Phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Ngâm tăm bông bệnh phẩm trong dung dịch trộn bệnh phẩm.

2.2. Nhỏ 200 μ l dung dịch pha loãng vào các giếng U, D, H.

2.3. Nhỏ 100 μ l dung dịch trộn bệnh phẩm vào các giếng U, X, H, D.

2.4. Trộn đều trong giếng D, hút 25 μ l sang các giếng U và H.

2.5. Đặt khay thử và để vào tủ ấm với nhiệt độ 37°C.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

4.1. Kết quả định danh

Quan sát	Kết quả
Có sự đổi màu ở giếng H (hồng tím)	Nuôi cấy dương tính
Không có sự đổi màu	Âm tính

4.2. Kết quả kháng sinh đồ

Quan sát	Kết quả
Có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh	R
Có sự đổi màu ở cả 1 trong 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh	I
Không có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh	S

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Nồng độ tủ ấm CO₂ không đủ tiêu chuẩn.
- Nhỏ dung dịch không chính xác.

66. *Rickettsia* Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM, IgG và IgA kháng *Rickettsia orientia tsusugamushi*.

2. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

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

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng	Test	3,000
11	Nước cất	ml	8,000
12	Đầu côn 1000 µl	Cái	2,000

13	Đầu côn 200 µl	Cái	5,000
14	Giấy thấm	Cuộn	0,100
15	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
16	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
17	Bút viết kính	Cái	0,020
18	Bút bi	Cái	0,010
19	Mũ	Cái	0,020
20	Khẩu trang	Cái	0,020
21	Găng tay	Đôi	0,100
22	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
23	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
26	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
27	Khăn lau tay	Cái	0,010
28	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, 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.

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem phụ lục 2).

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm *Rickettsia* Ab (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính <i>Rickettsia</i> Ab
1	Để số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
3	Chuẩn bị dung dịch rửa.
4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm.
5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
6	Rửa các giếng 1 lần bằng dung dịch rửa đã pha loãng.
7	Cho chứng và bệnh phẩm vào các giếng của phiến nhựa theo hướng dẫn của qui trình.

8	Đậy tấm và ủ.
9	Rửa phiến nhựa.
10	Chuẩn bị chất cộng hợp
11	Đậy tấm và ủ
12	Rửa phiến nhựa
13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
14	Ủ phiến nhựa , không đậy tấm và tránh ánh sáng
15	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
16	Đọc độ hấp thụ ở bước sóng 450 và 620 nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

Theo hướng dẫn của nhà sản xuất

2. Tính giá trị ngưỡng

Cut-off (CO)

3. Diễn giải kết quả

- Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Nếu kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

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 quy 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.

67. *Salmonella* Widal

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể O và H kháng *Salmonella* trong huyết thanh

2. Nguyên lý

Phản ứng ngưng kết.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy ly tâm thường.
- Ống nghiệm 12 mm.
- Micropipette các loại: 100 μ l, 500 μ l, 1000 μ l.
- Giá cầm ống nghiệm.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 1 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Tube thủy tinh làm xét nghiệm	Cái	14,000
5	Sinh phẩm chẩn đoán	ml	10,800
6	Khấu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	ml	0,100
7	NaCl 0.9 %	ml	2,000
8	Đầu cân 1000 μ l	Cái	8,000
9	Đầu cân 200 μ l	Cái	3,000
10	Giấy thấm	Cuộn	0,100
11	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
12	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
13	Bút viết kính	Cái	0,020
14	Bút bi	Cái	0,010

15	Mũ	Cái	0,020
16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	0,100
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
20	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
21	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
22	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
23	Khăn lau tay	Cái	0,010
24	QC (nếu thực hiện) *		0,100
25	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 thanh hoặc huyết tương của người 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).

2. Tiến hành kỹ thuật

Sinh phẩm chẩn đoán thương hàn của hãng Bio-Rad gồm 6 loại kháng nguyên TO, TH, AO, AH, BO, BH là các kháng nguyên thân và kháng nguyên lông của *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* (VD).

TT	Các bước thực hiện												
1.	Đề sinh phẩm ở nhiệt độ phòng 15-20 phút trước khi làm xét nghiệm												
2.	Kiểm tra tên, tuổi giữa bệnh phẩm và giấy xét nghiệm Ghi tên và đánh dấu từng ống xét nghiệm												
3.	Pha loãng huyết thanh (HT) người bệnh: + Pha loãng huyết thanh 1/10: 0,2ml huyết thanh + 1,8 ml NaCl 0,9% + Pha loãng huyết thanh 1/20: 0,1ml huyết thanh + 1,9 ml NaCl 0,9%												
4.	Cho vào các ống xét nghiệm theo sơ đồ												
	Ống	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

	nghiệm												
	HT pha loãn 1/20		0,1 ml		0,1 ml		0,1 ml		0,1 ml		0,1 ml		0,1 ml
	HT pha loãng 1/100	0,1 ml		0,1 l		0,1 m		0,1 ml		0,1 ml		0,1 ml	
	Kh n nguyên	0,9 ml TO	0,9 ml TO	0,9 ml TH	0,9 ml TH	0,9 ml AO	0,9 ml AO	0,9 ml AH	0,9 ml AH	0,9 ml BO	0,9 ml BO	0,9 ml BH	0,9 ml BH
	Độ pha loãng cuối cùng	1/10 0	1/2 00	1/1 00	1/2 00	1/1 00	1/2 00	1/10 0	1/20 0	1/10 0	1/20 0	1 1 00	1/2 0
5.	Ly tâm 3000 vòng trong 5 phút												
6.	Đọc kết quả bằng mắt thường hoặc kính lúp trên nền màu đen												

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Gõ nhẹ vào đáy của ống nghiệm và quan sát:

- **Phản ứng âm tính:** nếu hỗn hợp phản ứng đồng nhất.
- **Phản ứng dương tính:** các hạt ngưng kết có thể quan sát được bằng mắt thường.
 - + Kháng thể O: ngưng kết hạt nhỏ, bền vững, lác khó tan.
 - + Kháng thể H: ngưng kết như bông, hạt to, khi lắc dễ tan.
 - + Hiệu giá kháng thể được tính ở ống huyết thanh nào có độ pha loãng lớn nhất vẫn còn hiện tượng ngưng kết xảy ra.

Ví dụ: nếu hiện tượng ngưng kết với TO và TH xảy ra ở độ pha loãng 1:200, trong khi những ống nghiệm còn lại vẫn âm tính thì phải làm lại phản ứng bằng cách pha loãng huyết thanh ở độ pha loãng là 1:40, 1:80, 1:160. Mục đích để xác định lại hiệu giá kháng thể đối với TO, TH và hiệu giá cuối cùng đối với mẫu huyết thanh đã được pha loãng sẽ là 1:400, 1:800 và 1: 1600.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Âm tính giả: có thể do lấy máu quá sớm.
- Dương tính giả: gặp ở người bệnh nhiễm Rickettsia, một số trường hợp viêm gan mãn tính, nhiễm vi khuẩn gram (-).
- Phản ứng Widal chỉ có giá trị định hướng cho chẩn đoán.
- Có thể xảy ra hiện tượng ngưng kết vùng do đó dễ bỏ sót.
- Sai sót do người làm kỹ thuật.
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

68. *Streptococcus pyogenes* ASO

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể Anti Streptolysin O (ASO).

2. Nguyên lý

Dựa trên phản ứng ngưng kết thụ động (gián tiếp).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy ly tâm thường.
- Đồng hồ bấm giây.
- Micropipette
- Que trộn dùng một lần có sẵn trong hộp sinh phẩm
- Ống nghiệm vô trùng.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 5 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra lại	Test	0,400
11	Đầu côn 200 µl	Cái	2,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001

15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010
26	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 hoặc huyết tương của người 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).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Rapet ASO (VD).

Các bước thực hiện	Kỹ thuật
1	Đưa sinh phẩm ra ngoài nhiệt độ phòng Đánh số thứ tự các bệnh phẩm và số thứ tự trên tấm kính
2	Lắc nhẹ nhàng lọ chứa hạt latex, không được lắc quá mạnh
3	Dùng pipet nhỏ 1 giọt huyết thanh của người bệnh vào ô tương ứng đã đánh số trên phiến kính. Nhỏ chứng dương và chứng âm
4	Lắc nhẹ nhàng lọ có chứa hạt latex và nhỏ một giọt vào cạnh giọt huyết thanh của người bệnh
5	Trộn đều 2 loại với nhau bằng que trộn phủ đều bề mặt của mỗi ô.
6	Lắc đều cả phiến kính bằng tay hoặc dùng máy lắc 80-100 vòng trong 2 phút
7	Đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Ô chứng dương: có hiện tượng ngưng kết hạt latex
- Ô chứng âm: không có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy mịn, đồng nhất
- Ô không có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy mịn, đồng nhất: Âm tính
- Ô có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy thô, có hạt ngưng kết rõ trên nền đen: Ngưng kết hạt latex với nồng độ Anti Streptolysin O ≥ 200 IU/ml. Cần làm tiếp kỹ thuật bán định lượng nồng độ Anti Streptolysin O trong huyết thanh như sau:
 - + Pha loãng huyết thanh của người bệnh và tiếp tục làm phản ứng như ở phần trên:

Pha loãng huyết thanh	ASO (IU/ml) ($\pm 20\%$)
1 huyết thanh (HT) + 1 dung dịch đệm (DD) (1:2)	400 IU/ml
1 HT + 2 DD (1:3)	600 IU/ml
1 HT + 3DD (1:4)	800 IU/ml
1HT + 3DD (1:4)	1000 IU/ml

+ Ở độ loãng huyết thanh lớn nhất mà còn xảy ra hiện tượng ngưng kết thì đọc nồng độ ASO tương ứng ở đó. Ví dụ: ngưng kết xảy ra ở độ loãng huyết thanh lớn nhất là 1:4 thì nồng độ ASO là 800 IU/ml.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Nếu lắc quá thời gian (>2 phút) có thể xảy ra dương tính giả.
- Khi nồng độ ASO > 2000 IU/ml có thể ức chế sự ngưng kết. Trên lâm sàng mà có triệu chứng rõ thì cần pha loãng huyết thanh để làm phản ứng.

2. Xử trí: Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

69. *Treponema pallidum* soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt của *Treponema pallidum* tại tổn thương vết chancre hoặc ở nốt hồng ban.

2. Nguyên lý

Dựa trên hình ảnh sóng hình sin và tính chất di động đặc trưng của *T. pallidum* bằng kính hiển vi nền đen.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

Kính hiển vi nền đen

Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lam kính	Cái	2,000
2	Lamen	Cái	1,000
3	Kim chủng	Cái	1,000
4	Bông	Kg	0,001
5	Nước muối sinh lý NaCL 9 ⁰ / ₀₀	ml	2,000
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Mũ	Cái	0,020
8	Khẩu trang	Cái	0,020
9	Găng tay	Đôi	3,000
10	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
11	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
12	Bút viết kính	Cái	0,020
13	Bút bi	Cái	0,010
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
16	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
17	Khăn lau tay	Cái	0,030

18	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
20	QC (nếu thực hiện) *		0,1
21	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 tiết ở vết loét, sẩn, dịch chọc 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

- Tổn thương là vết trợt, vết loét: Rửa tổn thương bằng nước muối đẳng trương 0,9%, kẹp chặt thương tổn vào giữa ngón trỏ và ngón cái của bàn tay trái, dùng tăm bông sạch sát lên rìa thương tổn vài ba lần để lấy một ít dịch tiết thoát ra. Dàn lên một lam kính đã nhỏ sẵn một giọt nước muối sinh lý 0,9%.
- Tổn thương là sẩn, đào ban: Lau sạch tổn thương như trên. Dùng ngón cái nhẹ nhàng cào nhẹ lên tổn thương lấy ít dịch (tránh làm chảy máu).
- Tổn thương là hạch: Cố định hạch bằng hai ngón tay, dùng bơm tiêm vô trùng bơm vào hạch một ít nước muối sinh lý 9%, day nhẹ hạch rồi hút ra một ít dịch.

2. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị tiêu bản soi dưới kính hiển vi nền đen: Dàn bệnh phẩm lấy được vào giọt nước muối sinh lý 0,9% đã nhỏ sẵn trên lam kính, đặt lam lên.
- Soi ngay dưới kính hiển vi nền đen.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Thường đọc dưới vật kính x40.
- Xoắn khuẩn giang mai hình lò xo, vòng xoắn đều và mau, chiều dài khoảng 6-14 micromet, chiều ngang mảnh khoảng 0,15 micromet, trắng sáng trên nền đen, vừa tự dao động quanh trục vừa di chuyển.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Các tổn thương đã bôi chất sát khuẩn, uống thuốc kháng sinh hoặc tiêm thuốc kháng sinh đều khó tìm thấy xoắn khuẩn.
- Lấy bệnh phẩm lẫn nhiều máu, mủ thì khó nhận định.
- Kết quả khi đọc có thể nhầm với xoắn khuẩn sốt hồi qui, xoắn khuẩn gây bệnh ghẻ cóc... nên cần cán bộ có kinh nghiệm.

70. *Treponema pallidum* nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự có mặt của *Treponema pallidum* tại tổn thương vết chancre hoặc ở nốt hồng ban.

2. Nguyên lý

Dựa trên hình ảnh xoắn khuẩn sống hình sin bắt màu nâu đặc trưng khi nhuộm bằng phương pháp Fontana-Tribondeau.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

Kính hiển vi quang học

Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lam kính	Cái	2,000
2	Kim chủng	Cái	1,000
3	Dầu soi kính	ml	1,000
4	Xylen lau kính	ml	1,000
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Mũ	Cái	0,020
7	Khẩu trang	Cái	0,020
8	Găng tay	Đôi	3,000
9	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
10	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
11	Bút viết kính	Cái	0,020
12	Bút bi	Cái	0,010
13	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
14	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
15	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
16	Khăn lau tay	Cái	0,030

17	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
18	Dung dịch cố định (Ruge)	ml	1,000
19	Cồn 90 ⁰	ml	1,000
20	Dung dịch gấn màu Tanin	ml	1,000
21	Dung dịch Nitrat bạc AgNO ₃ 5%	ml	1,000
22	Dung dịch NH ₄ OH	ml	1,000
23	QC (nếu thực hiện) *		0,1
24	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Các tổn thương giang mai như chancre, chột, sần, mảng niêm mạc, 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

- Tổn thương là vết trợt, vết loét: Rửa tổn thương bằng nước muối đẳng trương 9‰, kẹp chặt thương tổn vào giữa ngón trỏ và ngón cái của bàn tay trái, dùng tăm bông sạch sát lên rìa thương tổn vài ba lần để lấy một ít dịch tiết thoát ra. Dàn lên một lam kính để khô tự nhiên.
- Tổn thương là sần, đào ban: Lau sạch tổn thương như trên, dùng ngón chỏ nhẹ nhàng sờ lên tổn thương lấy ít dịch (tránh làm chảy máu), dàn lên một lam kính để khô tự nhiên.
- Tổn thương là hạch: Cố định hạch bằng hai ngón tay, dùng bơm tiêm vô trùng bơm vào hạch một ít nước muối sinh lý 9‰, day nhẹ hạch hút ra một ít dịch rồi dàn mỏng lên lam kính để khô tự nhiên.

2. Tiến hành kỹ thuật

- Phủ dung dịch cố định Ruge trong khoảng 30-60 giây, đổ đi.
- Cố định bệnh phẩm bằng cồn 90 độ (để nghiêng, nhỏ từng giọt cồn, để cồn bay).
- Phủ dung dịch gấn màu Tanin lên lam kính, hơ trên ngọn lửa đèn cồn tới khi bốc hơi, để nguội rồi đổ đi và rửa nước.

- Thấm bạc: nhỏ một giọt dung dịch Nitrat bạc 5% -> tráng đều trên bệnh phẩm -> đổ đi, nhỏ dung dịch NH_4OH lên trên cho tới khi trong thì thôi - > hơ trên ngọn lửa đèn cồn đến khi bốc hơi -> để nguội rồi rửa nước. Để tiêu bản khô tự nhiên. Soi trên kính hiển vi quang học - vật kính dầu.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Soi ở vật kính dầu
- Hình ảnh xoắn khuẩn giống sóng hình sin đều, mảnh, bắt màu nâu xám trên nền vàng nhạt.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Dàn bệnh phẩm lên lam kính không được dày quá.
- Không hơ lam kính trên ngọn lửa đèn cồn quá lâu gây biến dạng xoắn khuẩn.

71. *Treponema pallidum* RPR định tính và định lượng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể kháng kháng nguyên Cardiolipin trong huyết tương (huyết thanh) của người bệnh bị giang mai.

2. Nguyên lý

Kháng nguyên Cardiolipin gắn trên hạt than khi cho tiếp xúc với huyết tương (huyết thanh) người bệnh bị giang mai sẽ cho phản ứng dương tính biểu hiện bằng hiện tượng lên bông.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy ly tâm thường.
- Máy lắc tròn.
- Tủ lạnh 4°C - 8°C
- Micropipette 50µl - 100 µl

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 1 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm RPR	Test	1,000
10	Khấu hao sinh phẩm RPR cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	6,000

11	Đầu côn 200 µl	Cái	6,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm RPR quicktest - Stanbio (VD)

2.1 Phản ứng RPR định tính

Các bước	Nội dung thực hiện
1	Đề sinh phẩm ở nhiệt độ phòng trước khi tiến hành phản ứng
2	Nhỏ mẫu (Huyết thanh) vào một vòng tròn trên bìa phản ứng, để giọt rơi tự do. Chứng dương, chứng âm tương ứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
3	Dàn đều mẫu trong giới hạn vòng tròn
4	Lắc nhẹ lọ kháng nguyên Nhỏ 1 giọt kháng nguyên vào vòng tròn đã có mẫu
5	Không khuấy trộn. Để tám phản ứng lên máy lắc và lắc ở tốc độ 100 vòng/phút trong 8 phút theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
6	Đọc kết quả trực tiếp ở nơi có đủ ánh sáng

2.2. Phản ứng RPR định lượng:

Thực hiện phản ứng bằng huyết thanh được pha loãng dần tới độ pha loãng lớn nhất còn cho kết quả dương tính. Pha loãng huyết thanh tiến hành với lượng gấp đôi: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16...

Các bước	Nội dung thực hiện
1	Đề sinh phẩm ở nhiệt độ phòng trước khi làm phản ứng.
2	Nhỏ 50 µl NaCL 9 ⁰ / ₀₀ vào vòng tròn trên bìa phản ứng từ số 2-5
3	Nhỏ 50 µl mẫu vào vòng tròn 1 và 2
4	Pha loãng bậc hai từ vòng tròn 2
5	Dàn đều mẫu trong giới hạn vòng tròn.
6	Nhỏ kháng nguyên vào vòng tròn đã có mẫu
7	Đề tấm phản ứng lên máy lắc và lắc ở tốc độ 100 vòng/phút trong 8 phút
8	Đọc kết quả trực tiếp ở nơi có đủ ánh sáng

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Phản ứng dương tính: Có các hạt kết cụm màu đen (hiện tượng lên bông) trên khắp mặt hoặc trung tâm vòng tròn của bìa phản ứng.

Phản ứng dương tính yếu: Có ít các hạt kết cụm màu đen bao quanh rìa vòng tròn bìa phản ứng.

Kết quả âm tính: đám than hoạt tập trung ở giữa vòng tròn, màu xám đồng nhất.

Nhận định kết quả RPR định lượng

Hiệu giá	Vòng tròn 1 1:1	Vòng tròn 2 1:2	Vòng tròn 3 1:4	Vòng tròn 4 1:8	Vòng tròn 5 1:16
1:2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
1:4	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
1:8	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
1:16	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Phản ứng có thể dương tính giả trong một số bệnh: Lupus ban đỏ, bệnh sốt rét, bệnh phong, bệnh tăng tế bào đơn nhân nhiễm trùng, phụ nữ có thai... những trường hợp này cần làm thêm phản ứng TPHA để xác định chẩn đoán.
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

72. *Treponema pallidum* TPHA định tính và định lượng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể kháng xoắn khuẩn giang mai trong huyết tương (huyết thanh) của người bệnh bị giang mai.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Tế bào (hồng cầu) đã được gắn kháng nguyên xoắn khuẩn giang mai, khi cho tiếp xúc huyết thanh (huyết tương) của người bệnh giang mai sẽ bị ngưng kết.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy lắc tròn tốc độ 100 vòng/ phút (nếu có).
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 4°C -8°C
- Micropipette các loại: 5 µl – 10 µl, 25 µl, 75 µl, 200 µl.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 1 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm TPHA	Test	1,000
10	Khấu hao sinh phẩm TPHA cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	6,000

11	Đầu cân 200 µl	Cái	6,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm TPHA new M của BIO-Rad (VD)

2.1. Phản ứng TPHA định tính

Các bước	Nội dung thực hiện
1.	Đề sinh phẩm ở nhiệt độ phòng Pha loãng huyết thanh 1/20
2.	Huyết thanh pha loãng 1/20 ở giếng số một nhỏ vào giếng thứ 2 và thứ 3
3.	Nhỏ control cell (dung dịch tế bào không gắn kháng nguyên) vào giếng 2 (độ pha loãng của huyết thanh là 1/80) theo hướng dẫn.
4.	Nhỏ test cell (dung dịch tế bào gắn kháng nguyên) vào giếng 3 (độ pha loãng của huyết thanh là 1/80) theo hướng dẫn.
5.	Lắc nhẹ phiên nhựa hoặc để máy rung ở tốc độ... trong 5 phút
6.	Đậy khay nhựa và để nhiệt độ phòng từ 45-60 phút
7.	Nhận định kết quả sau 45 – 60 phút

2.2. Phản ứng TPHA định lượng

Huyết thanh người bệnh được pha loãng theo tỷ lệ 1/20, 1/40, 1/80, 1/160...

Các bước	Nội dung thực hiện
1.	Pha loãng huyết thanh 1/20
2.	Nhỏ huyết thanh pha loãng 1/20 nhỏ vào giếng 2 và 3 theo hướng dẫn.
3.	Nhỏ dung dịch pha loãng huyết thanh vào mỗi giếng từ thứ 4 trở đi theo hướng dẫn.
4.	Nhỏ huyết thanh pha loãng 1/20 nhỏ vào giếng thứ 4 trộn đều, chuyển tiếp huyết thanh pha loãng sang giếng sau, tiếp tục như vậy tới độ pha loãng cần thiết theo hướng dẫn.
5.	Nhỏ dung dịch control cell vào giếng 2 theo hướng dẫn.
6.	Nhỏ test cell vào các giếng tiếp theo, theo hướng dẫn.
7.	Lắc nhẹ, để ở nhiệt độ phòng
8.	Nhận định kết quả sau 45 phút

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện phản ứng

- Giếng hai chứa mẫu bệnh phẩm với dung dịch tế bào không gắn kháng nguyên (control cell) phải âm tính: tế bào lắng xuống đáy giếng thành một nút nhỏ (nồng độ pha loãng 1:80).
- Mẫu xét nghiệm chứng dương phải dương tính.
- Mẫu xét nghiệm chứng âm phải âm tính

2. Đọc kết quả

Đặt nhẹ nhàng phiến nhựa lên mặt phẳng, đọc với nguồn ánh sáng trực tiếp. So sánh hình thái ngưng kết của các mẫu thử với mẫu chứng âm tính và chứng dương tính, nhận định kết quả theo bảng sau:

Kết quả	Test cell	Control cell
Dương tính mạnh	Tế bào ngưng kết dàn mỏng toàn bộ đáy giếng	Tế bào lắng tạo thành nút nhỏ ở đáy giếng
Dương tính yếu	Tế bào ngưng kết dàn mỏng 1/3 đáy giếng	Tế bào lắng tạo thành nút nhỏ ở đáy giếng
Âm tính	Tế bào lắng xuống tạo thành một nút nhỏ ở đáy giếng	Tế bào lắng tạo thành nút nhỏ ở đáy giếng
Không xác định*	Tế bào lắng xuống giống hình một cái nhẫn có viền đều xung quanh	Tế bào lắng tạo thành nút nhỏ ở đáy giếng
Phản ứng không đặc hiệu	Phản ứng dương tính	Phản ứng dương tính

* Nếu một mẫu ngưng kết với cả giếng có tế bào không gắn kháng nguyên (control cell) và giếng có tế bào gắn kháng nguyên (test cell) cần phải làm lại mẫu với thao tác hấp phụ:

- + Nhỏ 100 μ l mẫu bệnh phẩm vào ống nghiệm.
- + Nhỏ tiếp 400 μ l control cell.
- + Đồng nhất phản ứng bằng cách trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng 1 giờ.
- + Ly tâm ở 1000 vòng x15 phút.
- + Dùng pipet hút lấy nước nổi ở bề mặt (độ pha loãng mẫu là 1:5) để làm phản ứng. Cần phải tính toán lại khi pha loãng mẫu.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Thực hiện đúng các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

73. *Ureaplasma urealyticum* nuôi cấy, định danh và kháng thuốc

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện và định danh *U. urealyticum* bằng phương pháp nuôi cấy.

Xác định mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *U. urealyticum*.

2. Nguyên lý

Vi khuẩn được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa.

Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của *U. urealyticum* được xác định bằng phương pháp cấy trong canh thang đã có sẵn lượng kháng sinh nhất định. Đánh giá mức độ nhạy cảm với kháng sinh tùy theo khả năng mọc của vi khuẩn trong môi trường có chứa kháng sinh.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 ấm CO₂
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Bàn phụ khoa
- Đèn phụ khoa
- 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	Số lượng
1	Que lấy bệnh phẩm hoặc tăm bông vô trùng	Cái	2,000
2	Mỏ vệt (to, vừa và nhỏ)	Cái	1,000
3	Môi trường A7	Đĩa	1,000
4	Môi trường DUO KIT	Bộ	1,000
5	Bông	Kg	0,001
6	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
7	Đèn cồn	Cái	0,0001
8	Panh	Cái	0,0001

9	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
11	Mũ	Cái	0,020
12	Khẩu trang	Cái	0,020
13	Găng tay	Đôi	3,000
14	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
15	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
16	Hộp đựng dung dịch khử khuẩn ngâm mổ vệt	ml	10,000
17	Bút viết kính	Cái	0,020
18	Bút bi	Cái	0,010
19	Bật lửa	Cái	0,010
20	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
21	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Khăn lau tay	Cái	0,030
24	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
25	QC (nếu thực hiện) *		0,1
26	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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, mủ: dịch cổ tử cung, niệu đạo...

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 1 và Phụ lục 6)

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Ngâm tăm bông bệnh phẩm trong dung dịch trộn bệnh phẩm.

2.2. Nhỏ 200 μ l dung dịch pha loãng vào các giếng U, D, H.

2.3. Nhỏ 100 μ l dung dịch trộn bệnh phẩm vào các giếng U, X, H, D.

2.4. Trộn đều trong giếng D, hút 25 μ l sang các giếng U và H.

2.5. Dán khay thử và để vào tủ ẩm với nhiệt độ 37°C.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

4.3. Kết quả định danh

Quan sát	Kết quả
Có sự đổi màu ở giếng U (hồng tím)	Nuôi cấy dương tính
Không có sự đổi màu	Âm tính

4.4. Kết quả kháng sinh đồ

Quan sát	Kết quả
Có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh	R
Có sự đổi màu ở cả 1 trong 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh	I
Không có sự đổi màu ở cả 2 giếng chứa cùng một loại kháng sinh	S

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Nồng độ tủ ẩm CO₂ không đủ tiêu chuẩn.
- Nhỏ dung dịch không chính xác.

74. Virus test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên hoặc kháng thể của 1 số loại virus từ bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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
- Micropipette
- Đồng hồ bấm giây
- Máy ly tâm thường

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 10 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Ống lấy bệnh phẩm	Ống	1,000
2	Bơm tiêm	Cái	1,000
3	Bông	Kg	0,001
4	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	Ml	10,000
5	Panh	Cái	0,0001
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Hóa chất chính	Test	1,000
9	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	0,200
10	Đầu côn vàng	Cái	2,000
11	Axit ngậm rửa	Ml	10,000
12	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
13	Mũ	Cái	0,020

14	Khẩu trang	Cái	0,020
15	Găng tay	Đôi	2,000
16	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
17	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
18	Bút viết kính	Cái	0,020
19	Bút bi	Cái	0,010
20	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
21	Cồn sát trùng tay nhanh	ML	1,000
22	Dung dịch nước rửa tay	ML	8,000
23	Khăn lau tay	Cái	0,010
24	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Ly tâm ống bệnh phẩm

2.2. Bóc thanh xét nghiệm và ghi mã số bệnh phẩm tương ứng

Thực hiện các bước tiếp theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Đọc kết quả trước hoặc sau thời gian qui định có thể làm sai lệch kết quả.
- Cho quá ít bệnh phẩm, hay quá nhiều dung dịch pha loãng có thể làm kết quả khó đọc.
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất

75. Virus Ag miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên virus từ bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kết hợp kháng nguyên và kháng thể thực hiện trên hệ thống miễn dịch tự động.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có)
- Tủ lạnh
- Micropipette
- Máy ly tâm thường.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 5 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Ống lấy bệnh phẩm	Cái	1,000
2	Bông	Kg	0,001
3	Dây garô	Cái	0,001
4	Cồn	ml	3,000
5	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
6	Panh	Cái	0,0001
7	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
9	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000

10	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,400
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,005
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,005
14	Control	Test	0,300
15	Ngoại kiểm*		0,020
16	Elecsys clean-cell M	ml	5,000
17	Procell M	ml	5,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	Chiếc	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	Chiếc	3,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ML	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ML	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ML	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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

3. 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys trên hệ thống máy miễn dịch tự động Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm virus Ag miễn dịch
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test cần xét nghiệm
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Kết quả được hiển thị tự động trên máy miễn dịch. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Dung dịch huyết thanh/huyết tương phải đảm bảo, tránh còn lẫn hồng cầu
- Huyết thanh/huyết tương có bọt khí sẽ làm sai lệch kết quả
- Tránh làm thuốc thử có bọt

76. Virus Ab miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể (Ab) kháng virus trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kết hợp kháng nguyên và kháng thể thực hiện trên hệ thống miễn dịch tự động.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Bộ lưu điện
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có)
- Tủ lạnh
- Micropipette
- Máy ly tâm thường.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 5 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Ống lấy bệnh phẩm	Cái	1,000
2	Bông	Kg	0,001
3	Dây garô	Cái	0,001
4	Cồn	Ml	3,000
5	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
6	Panh	Cái	0,0001

7	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
9	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
10	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,400
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,005
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,005
14	Control	Test	0,300
15	Ngoại kiểm*		0,020
16	Elecsys clean-cell M	ml	5,000
17	Procell M	ml	5,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	Chiếc	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	Chiếc	3,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo	Bộ	0,005

34	Dung dịch nước rửa tay	MI	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	MI	1,000
36	Dung dịch khử trùng	MI	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys trên hệ thống máy miễn dịch tự động Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm virus Ab miễn dịch
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test cần xét nghiệm
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Kết quả được hiển thị tự động trên máy miễn dịch. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Dung dịch huyết thanh/huyết tương phải đảm bảo, tránh còn lẫn hồng cầu
- Huyết thanh có bọt khí sẽ làm sai lệch kết quả.
- Tránh làm thuốc thử có bọt.

77. HBsAg test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên HBsAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Micropipette 50 µl -100 µl.
- Máy ly tâm thường.
- Đồng hồ bấm giây

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 10 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng	Test	0,200
6	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
7	Đầu côn 200 µl	Cái	1,200
8	Giấy thấm	Cuộn	0,100
9	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
10	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
11	Bút viết kính	Cái	0,020
12	Bút bi	Cái	0,010
13	Mũ	Cái	0,020
14	Khẩu trang	Cái	0,020

15	Găng tay	Đôi	0,100
16	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
17	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
18	Dung dịch nước rửa tay	ML	8,000
19	Cồn sát trùng tay nhanh	ML	1,000
20	Dung dịch khử trùng	ML	10,000
21	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Determine (VD).

Các bước	Xét nghiệm phát hiện HBsAg nhanh
1	Tách rời từng thanh xét nghiệm rồi bóc vỏ Ghi mã bệnh phẩm tương ứng
2	Nhỏ 50 µl huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm
3	Chờ 15 phút đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dương tính: Xuất hiện 2 vạch đỏ ở phần chứng và phần bệnh phẩm.
- Âm tính: Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần chứng.
- Không xác định:
 - + Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần bệnh phẩm.
 - + Không có vạch đỏ nào xuất hiện ở phần chứng và phần bệnh phẩm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Thời gian đọc kết quả → ghi lại thời gian làm xét nghiệm và thời gian đọc kết quả để tránh dương tính giả và âm tính giả.
- Chất lượng bệnh phẩm: những mẫu bệnh phẩm tan huyết sẽ ảnh hưởng đến chất lượng và kết quả xét nghiệm.

78. HBsAg miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên HBsAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD)

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette 100 μl , 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 20 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm	Test	0,200

	tra chất lượng		
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,005
7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,005
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	2,000
10	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,000
11	Đầu cân 200 µl	Cái	1,050
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm MONOLISA HBsAg Ultra Bio-Rad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HBsAg
1	Chuẩn bị sinh phẩm, sơ đồ nhỏ mẫu
2	Chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng. Chuẩn bị dung dịch cộng hợp Chuẩn bị số giếng cần dùng.
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm theo thứ tự hướng dẫn
4	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
5	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
6	Rửa phiến phản ứng và làm khô
7	Pha dung dịch cơ chất TMB và nhỏ vào mỗi giếng.
8	Để ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) tránh ánh sáng theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
9	Dừng phản ứng
10	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620 nm bằng máy đo mật độ quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện

- NC: Độ hấp phụ của chứng âm (R3).
- PC: Độ hấp phụ của chứng dương.
- CO: Giá trị ngưỡng.
- NC_x: Giá trị trung bình của chứng âm.
- $NC \leq 0,08$.
- $PC \geq 1,000$.
- $NC_x = R3 \text{ OD} / 4$.
- Loại chứng âm $NC > 0,08$ hoặc $NC > 40\% NC_x$. Chỉ được loại 1 chứng âm và tiếp tục tính kết quả theo 3 chứng âm còn lại.

2. Nhận định, trả lời kết quả

$$\text{Tỉ lệ} = \frac{\text{OD mẫu}}{\text{Giá trị ngưỡng}} \quad \text{CO} = NC_x + 0,05$$

Kết quả

- Mẫu huyết thanh có giá trị tỉ lệ < 1 được coi là âm tính.
- Mẫu huyết thanh có giá trị tỉ lệ ≥ 1 được làm lại. Nếu lần xét nghiệm thứ 2 giá trị tỉ lệ ≥ 1 . Mẫu huyết thanh coi là dương tính.
- Mẫu huyết thanh có $0,9 < \text{tỉ lệ} < 1$. xét nghiệm lại 2 lần:
 - + Giá trị tỉ lệ xét nghiệm lặp lại ≥ 1 : mẫu được coi là dương tính.
 - + Giá trị tỉ lệ xét nghiệm lặp lại có $0,9 < \text{tỉ lệ} < 1$: nên xét nghiệm lại cho người bệnh bằng phương pháp khác hoặc yêu cầu lấy lại bệnh phẩm.

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 oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

79. HBsAg miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên HBsAg của virus viêm gan B (HBV) trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

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

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 200 mẫu/lần thực hiện (VD).

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,002
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,010
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,005

13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,005
14	Chứng nội kiểm	Test	0,010
15	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
16	Cleancell M	ml	2,060
17	Procell M	ml	2,060
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	Chiếc	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	Chiếc	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys HBsAg II - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HbsAg
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng, chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là HbsAg
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có).

3. Kết quả và báo cáo

- Mẫu huyết thanh: Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên số đo của Cal1 và Cal2. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

Kết quả được diễn giải như sau:

- Nếu $COI < 0.90$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với HBsAg.
- Nếu $0.90 \leq COI \leq 1.0$: mẫu bệnh phẩm này cần phải kiểm tra lại
- Nếu $COI > 1.0$:
 - + Mẫu bệnh phẩm có $COI > 70$: được coi là dương tính với HBsAg
 - + Mẫu bệnh phẩm có $COI < 70$: thực hiện lại xét nghiệm với cùng phương pháp hoặc với một phương pháp khác (ELISA)

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).
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

80. HBsAg khắ²ng đị²nh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Khắ²ng đị²nh sự hiện diện của kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) trong mẫu huyết thanh và huyết tương đã có phản ứng dương tính lặp lại khi xét nghiệm bằng các kỹ thuật miễn dịch.

2. Nguyên lý

Khắ²ng đị²nh sự hiện diện của kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) dựa theo nguyên lý trung hòa kháng thể đặc hiệu.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động hoặc bán tự động.
- Máy ly tâm thường.
- Micropipette loại 200 μ l và 1000 μ l.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 200 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	1,000
9	HBsAg 2 Elec	Test	4,000

10	HBsAg Confirmation	Test	4,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,002
12	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,010
13	Control	Test	2,000
14	Cleancell M	ml	8,000
15	Procell M	ml	8,000
16	Probe Wash M	ml	2,000
17	Preclean M	ml	2,000
18	Assay Tip/Cup E170	chiếc	8,000
19	ISE Cleaning Solution F, HIT	ml	0,500
20	Nước cất	Cái	5,000
21	Sample cup	Cuộn	1,000
22	Giấy thấm	Cuộn	0,100
23	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
25	Bút viết kính	Cái	0,020
26	Bút bi	Cái	0,010
27	Mũ	Cái	0,020
28	Khẩu trang	Cái	0,020
29	Găng tay	Đôi	0,100
30	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
31	Quần áo	Bộ	0,005
32	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
33	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
34	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
35	Khăn lau tay	Cái	0,010

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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys HBsAg Confirmatory test – Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm HBsAg khẳng định
1	Tiền xử lý mẫu: - Mẫu dương tính có chỉ số ngưỡng < 7.0: 270 µL mẫu + 30 µL thuốc thử khẳng định 270 µL mẫu + 30 µL thuốc thử chứng hoặc - Mẫu dương tính có chỉ số ngưỡng trong khoảng 7.0 và < 30: 150 µL mẫu + 150 µL thuốc thử khẳng định 150 µL mẫu + 150 µL thuốc thử chứng hoặc - Mẫu dương tính có chỉ số ngưỡng ≥ 30 Tiền pha loãng mẫu theo tỷ lệ 1:20 với Diluent Universal 150 µL mẫu pha loãng + 150 µL thuốc thử khẳng định 150 µL mẫu pha loãng + 150 µL thuốc thử chứng PreciControl HBsAg II 2, mẫu chứng dương, nên chạy song hành như kiểm tra hiệu năng xét nghiệm: 270 µL PreciControl HBsAg II 2 + 30 µL thuốc thử khẳng định 270 µL PreciControl HBsAg II 2 + 30 µL thuốc thử chứng Ủ hỗn hợp phản ứng: 30-60 phút ở 15-25 °C hoặc qua đêm ở 2-8 °C.
2	Xét nghiệm Elecsys HBsAg II: theo hướng dẫn của nhà sản xuất

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm HBsAg định tính (nếu có).

3. Kết quả và báo cáo

3.1 Đánh giá hiệu lực xét nghiệm

- Chỉ số ngưỡng của PreciControl HBsAg II 2 trong xét nghiệm với thuốc thử khẳng định phải < 50 % so với chỉ số ngưỡng trong xét nghiệm với thuốc thử chứng:

COI cho xét nghiệm với thuốc thử chứng ~ 100 %

COI cho xét nghiệm với thuốc thử khẳng định ~ x %

Nếu x > 50 %, cần kiểm tra điều kiện thực hiện xét nghiệm. Nếu cần thiết, lặp lại xét nghiệm với thuốc thử mới.

- Mẫu được đánh giá là có hiệu lực khi chỉ số ngưỡng của mẫu xử lý với thuốc thử chứng phải ≥ 0.9.

Chỉ số ngưỡng < 0.9 cho biết tỷ lệ pha loãng quá cao. Các mẫu này phải được xét nghiệm lại với mẫu không pha loãng hoặc tỷ lệ pha loãng thấp hơn.

3.2 Đánh giá và biện luận kết quả

• Để khẳng định mẫu có kết quả Dương tính, chỉ số ngưỡng của mẫu với thuốc thử khẳng định phải < 50 % so với chỉ số ngưỡng của mẫu với thuốc thử chứng, và chỉ số ngưỡng này phải ≥ 0.9 .

Đánh giá:

COI cho xét nghiệm với thuốc thử chứng $= \wedge 100 \%$

COI cho xét nghiệm với thuốc thử khẳng định $= \wedge x \%$

Biện luận:

$x > 50 \%$ và COI cho thuốc thử chứng ≥ 0.9 = Âm tính

$x > 50 \%$ và COI cho thuốc thử chứng < 0.9 = Không giá trị

$x < 50 \%$ và COI cho thuốc thử chứng ≥ 0.9 = Dương tính

$x < 50 \%$ và COI cho thuốc thử chứng < 0.9 = Không xác định

Sử dụng thuốc thử mới và đo lại các mẫu có kết quả không giá trị.

Trong trường hợp kết quả vẫn không giá trị, nên xét nghiệm mẫu theo dõi tiếp theo.

Nên đo lặp lại các kết quả không xác định. Trong trường hợp kết quả vẫn không xác định, nên xét nghiệm mẫu theo dõi tiếp theo.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Máy sẽ báo sample short (bệnh phẩm đông hoặc không đủ) →. Chú ý hút mẫu ra cup đủ thể tích (ít nhất 200 μ l).
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm và chứng).
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

81. HBsAg định lượng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy Cobas e 6000 (VD).
- Bộ lưu điện.
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 2 µl đến 200 µl .
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20⁰ C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 5 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm	Test	0,400

	tra chất lượng		
11	Control	Test	0,010
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,005
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,005
14	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
15	Diluent Universal	ml	1,000
16	Elecsys clean-cell M	ml	5,000
17	Procell M	ml	5,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	chiếc	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	chiếc	3,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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

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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys HBsAg II Quant - Roche (VD)

Độ pha loãng bệnh phẩm đã được cài đặt mặc định là 1:400

Các bước	Xét nghiệm định lượng HBsAg
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode:	
1.	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương, EQC vào sample cup tương ứng
2.	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3.	Nhập mã bệnh phẩm
4.	Chọn tên test là HBsAg-Quant
5.	Vào Barcode Read Error
6.	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7.	Đặt mẫu cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
8.	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode:	
1.	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2.	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3.	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

3. Kết quả và báo cáo

Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là một giá trị cụ thể.

3.1. Bệnh phẩm pha loãng 1/400: Dải định lượng là 20 - 52.000 IU/ml.

* Nếu giá trị đo được nằm trong dải định lượng này thì kết quả cuối cùng là kết quả đo được trên máy.

* Nếu giá trị đo được < 20 → chạy lại bệnh phẩm không pha loãng.

* Nếu giá trị đo được > 52.000 → Pha loãng bệnh phẩm 1: 100 và chạy lại xét nghiệm theo các bước chạy mẫu.

3.2. Bệnh phẩm không pha loãng: Dải định lượng là 0,05 - 130 IU/ml.

Ngưỡng phát hiện: 0,05 IU/ml

* Nếu giá trị đo được thấp hơn ngưỡng phát hiện thì máy báo $< 0,05$ → Xét nghiệm lại HBsAg định tính.

- Nếu HBsAg âm tính → Trả kết quả âm tính

- Nếu HBsAg âm tính → Trả kết quả dưới ngưỡng phát hiện.

* Nếu giá trị đo được lớn hơn dải định lượng thì máy báo > 130 → Trả kết quả > 130 IU/ml

3.3. Bệnh phẩm pha loãng 1: 100

Những mẫu bệnh phẩm ở nồng độ pha loãng 1:400 cho kết quả > 52.000 thì pha loãng bệnh phẩm 1: 100 với dung dịch Dil Hep được cung cấp sẵn trong bộ sinh phẩm (như vậy mẫu đã được pha loãng 40.000 lần) và chạy lại xét nghiệm theo các bước chạy mẫu ở phần II.2.

Kết quả cuối cùng (IU/ml) = giá trị đo được trên máy x 100

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ) → Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).

82. HBsAb miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HBsAb trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette vi lượng 100, 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khâu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,600
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,033
7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,033
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	2,000

10	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,000
11	Đầu cân 200 µl	Cái	3,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 người.

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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm MONOLISA Anti – HBs PLUS Bio-Rad (VD)

Các bước	Xét nghiệm xác định Anti HBs
1	Chuẩn bị sinh phẩm, tấm phản ứng, sơ đồ nhỏ mẫu
2	Nhỏ dung dịch loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng.
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm, theo thứ tự hướng dẫn
4	Đậy tấm và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Chuẩn bị dung dịch rửa. Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng

7	Đậy nắp và ủ nhiệt theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc kết quả ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện

- Giá trị trung bình của Calibrator 10 mIU/ml (C1) là giá trị ngưỡng của phản ứng (Cut-off).
- Độ hấp phụ của chứng âm phải $0,000 < OD_{CO} \leq 0,070$.
- Độ hấp phụ của chứng dương C2 phải $OD_{CO} \geq 0,400$.
- Nếu một trong các giá trị của chứng âm hoặc chứng dương ở ngoài khoảng cho phép thì phản ứng không có giá trị và phải làm lại.
- Độ hấp phụ của Calibrator 10 mIU/ml phải $0,050 \leq OD_{C1} \leq 0,200$ và $OD_{C1} \geq (1,5 \times OD_{CO})$.

Nếu một trong hai giá trị của Calibrator 10 mIU/ml (C1) OD_{C1} ở ngoài khoảng cho phép thì phản ứng không có giá trị và phải làm lại.

2. Kết quả và biện luận

Sự có mặt hay không có mặt của anti-HBs được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng.

- **Kết quả âm tính:** Mẫu thử có $OD < C.O$ được coi như âm tính với MONOLISA Anti-HBs PLUS.
- **Kết quả dương tính:** Mẫu thử có $OD \geq C.O$ được coi như dương tính với MONOLISA Anti-HBs PLUS.

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.
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

83. HBsAb định lượng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Định lượng kháng thể HBsAb trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang).
(VD)

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 10 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,200

11	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,005
12	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,005
13	Chứng nội kiểm	Test	0,300
14	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
15	Elecsys clean-cell M	ml	5,000
16	Procell M	ml	5,000
17	Probe Wash M	ml	2,000
18	Preclean M	ml	2,000
19	Assay Tip/Cup E170	Chiếc	3,000
20	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
21	Nước cất	ml	5,000
22	Sample cup	Chiếc	3,000
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay	Đôi	0,100
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
36	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 người.

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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Anti-HBs Elecsys - Roche (VD).

Các bước	Xét nghiệm định lượng HBsAb
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là anti – HBs
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Kiểm tra chất lượng

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và trong mỗi lô hóa chất Anti HBs khác nhau có thể có sự thay đổi về giới hạn chứng.

2. Kết quả và báo cáo

Máy sẽ tự động tính toán nồng độ phân tích của mỗi mẫu bệnh phẩm theo đơn vị IU/l. Dải đo được giới hạn từ 2.00 – 1000 IU/l (được xác định bằng giới hạn thấp nhất và giới hạn cao nhất của đường cong chuẩn)

Nhận định kết quả

- Những mẫu có nồng độ < 10 IU/l: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với anti-HBs.
- Những mẫu có nồng độ ≥ 10 IU/l: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với anti-HBs.
- Những mẫu có giá trị ≥ 1000 IU/l thì có thể pha loãng với dung dịch pha loãng bệnh phẩm (Elecsys Diluent Universal) theo tỷ lệ 1:100. Kết quả định lượng anti-HBs sau khi đã pha loãng phải > 10 IU/l.

- + Nếu pha loãng bằng tay thì tính kết quả bằng cách nhân kết quả hiển thị trên máy với độ pha loãng.
- + Nếu pha loãng tự động bằng máy thì máy sẽ tự động tính toán kết quả bằng phần mềm đã có sẵn

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).
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

84. HBc IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HBc-IgM trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette 100 μl , 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,600
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,033
7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,033

8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	2,000
10	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,000
11	Đầu cân 200 µl	Cái	3,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm MONOLISA Anti – HBc IgM PLUS Bio-Rad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HBc IgM
1.	Chuẩn bị sinh phẩm, sơ đồ nhỏ mẫu Chuẩn bị dung dịch rửa
2.	Pha loãng bệnh phẩm trong dung dịch pha loãng bệnh phẩm theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
3.	Rửa giếng phản ứng theo hướng dẫn quy trình
4.	Nhỏ chứng và bệnh phẩm theo thứ tự hướng dẫn

5.	Ủ khay phản ứng trong thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn.
6.	Rửa khay phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất
7.	Chuẩn bị dung dịch cộng hợp Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
8.	Ủ tấm phản ứng ở nhiệt độ thích hợp trong thời gian quy định theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
9.	Rửa khay phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất
10.	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) và tránh ánh sáng theo hướng dẫn.
11.	Dùng phản ứng
12.	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện

- Giá trị trung bình chứng dương phải ≥ 0.400 .
- Nếu một giá trị của chứng dương nằm ngoài giới hạn này hoặc sai khác trên 25 % giá trị trung bình, cần phải tính lại lần nữa với hai giá trị chứng dương còn lại.
- Giá trị trung bình chứng âm phải ≤ 0.100 .

2. Kết quả và báo cáo

- Tính giá trị trung bình của chứng âm (OD R3):

$$\overline{\text{OD R3}} = \text{Tổng của OD R3} / 3$$
- Tính giá trị trung bình của chứng dương (OD R4):

$$\overline{\text{OD R4}} = \text{Tổng của OD R4} / 3$$
- **Tính giá trị ngưỡng (CO)**

$$\text{CO} = \overline{\text{OD R3}} + (\overline{\text{OD R4}} / 7)$$
- **Giá trị của thử nghiệm:**
Tính tỉ số mẫu:

$$\text{Tỉ số mẫu} = \text{OD mẫu} / \text{CO}$$

Giải thích kết quả

- Các mẫu có tỉ số mẫu nhỏ hơn 1 được coi là âm tính với anti-HBc IgM.
- Các mẫu có tỉ số mẫu ≥ 1 được coi là dương tính với anti-HBc IgM.

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.
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

85. HBc IgM miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HBc-IgM trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Micropipette thể tích 50 µl - 200 µl

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 5 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100

11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,400
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,005
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,005
14	Chứng nội kiểm	Test	0,400
15	Ngoại kiểm (nếu có)*	ml	0,020
16	Cleancell M	ml	3,000
17	Procell M	ml	3,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	chiếc	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	chiếc	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys Anti-HBc IgM - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-HBc IgM
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là anti-HBc IgM
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2. Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và trong mỗi lô hóa chất Anti-HBc IgM khác nhau có thể có sự thay đổi về giới hạn chứng

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có).

3. Kết quả và báo cáo

Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên số đo của Cal1 và Cal2. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

- Nếu $COI \geq 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với Anti-HBc IgM.

- Nếu $COI < 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với Anti-HBc IgM.

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).
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

86. HBc total miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể tổng số HBc Ab total kháng HBcAg trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20⁰C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Micropipette 100 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khâu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,600
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,033

7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,033
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	2,000
10	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,000
11	Đầu cân 200 µl	Cái	3,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm MONOLISA Anti – HBc Total PLUS Bio-Rad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti HBc Total
1	Chuẩn bị sinh phẩm, sơ đồ nhỏ mẫu
2	Nhỏ dung dịch pha loãng
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm theo thứ tự hướng dẫn
4	Ủ khay nhựa theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Rửa khay phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	Ủ khay phản ứng ở nhiệt độ phòng theo hướng dẫn.

8	Rửa khay phản ứng và làm khô.
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) và tránh ánh sáng theo hướng dẫn.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện

- Đối với chứng âm: mỗi giá trị hấp thụ đơn phải nhỏ hơn 0.100.
- Đối với chứng dương:
 - + Mỗi giá trị hấp thụ phải lớn hơn hoặc bằng 1.000 và nhỏ hơn hoặc bằng 2.400.
 - + Nếu một giá trị của chứng dương nằm ngoài giới hạn này hoặc sai khác trên 30% giá trị trung bình, cần phải tính lại lần nữa với hai giá trị chứng dương còn lại.

Xét nghiệm nên được thực hiện lặp lại nếu có trên một giá trị chứng dương nằm ngoài các giới hạn ở trên.

2. Kết quả và báo cáo

Tính giá trị trung bình của độ hấp thụ đối với huyết thanh chứng dương (OD R4)

$$\text{Giá trị trung bình OD R4} = \frac{\text{Tổng mật độ quang học}}{3}$$

Tính giá trị ngưỡng (CO)

$$\text{CO} = \frac{\text{Giá trị trung bình OD R4}}{5}$$

Giải thích kết quả

- Các mẫu có giá trị OD < giá trị ngưỡng được coi là âm tính với xét nghiệm MONOLISA anti-HBc PLUS.
- Các mẫu có giá trị OD ≥ giá trị ngưỡng được coi là dương tính ban đầu với xét nghiệm MONOLISA anti-HBc PLUS và phải được xét nghiệm lại bằng xét nghiệm tương tự trước khi đưa ra nhận định cuối cùng.
- Các kết quả nằm dưới giá trị ngưỡng CO – 10% < OD nên được nhận định một cách thận trọng (nên thực hiện xét nghiệm lại các mẫu liên quan bằng xét nghiệm lặp lại 2 lần khi hệ thống sử dụng và quy trình thí nghiệm cho phép điều đó).

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.
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

87. HBc total miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể tổng số HBc Ab total kháng HBcAg trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD)

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2°C - 8°C

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 5 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra	Test	0,400

	chất lượng		
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,005
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,005
14	Chứng nội kiểm	Test	0,400
15	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
16	Cleancell M	ml	3,000
17	Procell M	ml	3,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	chiếc	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	chiếc	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm Elecsys Anti-HBc - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-HBc
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là anti-HBc
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2. Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và trong mỗi lô hóa chất Anti-HBc khác nhau có thể có sự thay đổi về giới hạn chứng

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có)

3. Kết quả và báo cáo

Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên số đo của Cal1 và Cal2. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

- Nếu $COI \leq 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với Anti-HBc.
- Nếu $COI > 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với Anti-HBc.
- Tất cả những mẫu dương tính cần phải kiểm tra lại 2 lần trên cùng bộ sinh phẩm Elecsys Anti-HBc:
 - + Nếu cả hai kết quả lặp lại > 1 : Kết luận âm tính
 - + Nếu một trong hai lần lặp lại có kết quả ≤ 1.0 : Kết luận dương tính.

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).
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

88. HBeAg miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette 100 μl , 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 20 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,300
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,010

7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,010
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	2,000
10	Đầu cân 1000 µl	Cái	0,100
11	Đầu cân 200 µl	Cái	1,100
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm MONOLISA HBeAg/Ab Plus Bio-Rad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HbeAg
1	Chuẩn bị sinh phẩm xét nghiệm, sơ đồ mẫu
2	Nhỏ bệnh phẩm và chứng theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
3	Ủ tấm phản ứng theo hướng dẫn quy trình của nhà sản xuất.
4	Pha dung dịch rửa

	Rửa tấm phản ứng theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Pha dung dịch cộng hợp Nhỏ dung dịch cộng hợp vào giếng phản ứng
6	Ủ tấm phản ứng trong thời gian và nhiệt độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
7	Rửa tấm phản ứng theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Pha dung dịch cơ chất Nhỏ dung dịch cơ chất vào mỗi giếng phản ứng
9	Đề tấm phản ứng trong tối theo quy trình ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) như hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc kết quả ở bước sóng 450/620 nm-700 nm bằng máy đo mật độ quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện

NC: Độ hấp phụ của chứng âm (R3).

PC: Độ hấp phụ của chứng dương.

CO: Giá trị ngưỡng.

NC_x: Giá trị trung bình của chứng âm.

$$NC_x = R3 \text{ OD} / 3.$$

Loại chứng âm lớn hơn 25% giá trị trung bình chứng âm. Chỉ được loại 1 chứng âm và tính kết quả theo 2 chứng âm còn lại.

$$CO = NC_x + 0,025.$$

$$NC_x < 0,060.$$

$$PC > 0,800.$$

$$\text{Tỉ lệ} = \frac{\text{OD mẫu}}{\text{Giá trị ngưỡng}}$$

2. Nhận định, trả lời kết quả

Mẫu huyết thanh:

+ Dương tính: khi có giá trị tỉ lệ ≥ 1 .

+ Âm tính: khi có giá trị tỉ lệ < 1 .

Trường hợp dương tính nên xét nghiệm lại 2 giếng. Nếu có ít nhất 1 giá trị dương, mẫu 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.
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) ,
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

89. HBeAg miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD)

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette thể tích 50 μl - 200 μl

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 15 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,050
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,150
7	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,010
8	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,010
9	Chứng nội kiểm	Test	0,010

10	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
11	Cleancell M	ml	3,000
12	Procell M	ml	3,000
13	Probe Wash M	ml	2,000
14	Preclean M	ml	2,000
15	Assay Tip/Cup E170	Cái	3,000
16	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
17	Nước cất	ml	5,000
18	Sample cup	Chiếc	1,000
19	Giấy thấm	Cuộn	0,100
20	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
21	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
22	Bút viết kính	Cái	0,020
23	Bút bi	Cái	0,010
24	Mũ	Cái	0,020
25	Khẩu trang	Cái	0,020
26	Găng tay	Đôi	0,100
27	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
28	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
29	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
30	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
31	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
32	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys HBeAg - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm xác định HbeAg
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là HbeAg
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có).

3. Kết quả và báo cáo

- Mẫu huyết thanh: Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên số đo của Cal1 và Cal2. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

+ Nếu $COI < 1$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với HBeAg.

+ Nếu $COI \geq 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với HBeAg.

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).

90. HBeAb miễn dịch bán tự động

I. NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HBeAb (Anti-HBe) trong huyết thanh (huyết tương).

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 24°C - 8°C
- Micropipette 100 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 20 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,300
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,010
7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,010

8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	2,000
10	Đầu cân 1000 µl	Cái	0,100
11	Đầu cân 200 µl	Cái	1,100
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm MONOLISA HBeAg/Ab Plus Bio-Rad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính anti-Hbe
1	Chuẩn bị sinh phẩm xét nghiệm Tắm phản ứng, sơ đồ mẫu
2	Nhỏ bệnh phẩm và chứng theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất
3	Nhỏ dung dịch kháng nguyên trung hòa vào mỗi giếng
4	Ủ tấm phản ứng ở nhiệt độ và trong thời gian thích hợp theo

	hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Chuẩn bị dung dịch rửa Rửa tấm phản ứng theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào giếng phản ứng
7	Ủ tấm phản ứng ở nhiệt độ và trong thời gian thích hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
8	Pha dung dịch cơ chất theo hướng dẫn.
9	Chuẩn bị dung dịch cơ chất Nhỏ dung dịch cơ chất vào mỗi giếng phản ứng
10	Đề tấm phản ứng trong tối ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
11	Dừng phản ứng.
12	Đọc kết quả ở bước sóng 450/620 nm-700 nm bằng máy đo mật độ quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1.Điều kiện

NC: Độ hấp phụ của chứng âm (R3).

PC: Độ hấp phụ của chứng dương.

CO: Giá trị ngưỡng.

NC_x: Giá trị trung bình của chứng âm.

NC_x = R3 OD / 3.

Loại chứng âm lớn hơn 25% giá trị trung bình chứng âm. Chỉ được loại 1 chứng âm và tính kết quả theo 2 chứng âm còn lại.

CO = NC_x x 0,4.

NC_x > 0,900.

PC < 0,150.

Tỉ lệ = $\frac{\text{OD mẫu}}{\text{Giá trị ngưỡng}}$

2.Nhận định, trả lời kết quả

Mẫu huyết thanh:

+ Dương tính: khi có giá trị tỉ lệ ≤ 0,9.

+ Âm tính: khi có giá trị tỉ lệ > 1,1.

Tuy nhiên, thận trọng khi 0,9 < giá trị tỷ lệ < 1,1. Nên làm lại xét nghiệm.

Trường hợp dương tính nên xét nghiệm lại 2 giếng. Nếu có ít nhất 1 giá trị dương, mẫu được coi là dương tính.

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.
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...),
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

91. HBeAb miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HBeAb (Anti-HBe) trong huyết thanh (huyết tương) .

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- 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)

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 15 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,050
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,150
7	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,010
8	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,010
9	Chứng nội kiểm	Test	0,010
10	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

11	Cleancell M	ml	3,000
12	Procell M	ml	3,000
13	Probe Wash M	ml	2,000
14	Preclean M	ml	2,000
15	Assay Tip/Cup E170	Cái	3,000
16	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
17	Nước cất	ml	5,000
18	Sample cup	Chiếc	1,000
19	Giấy thấm	Cuộn	0,100
20	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
21	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
22	Bút viết kính	Cái	0,020
23	Bút bi	Cái	0,010
24	Mũ	Cái	0,020
25	Khẩu trang	Cái	0,020
26	Găng tay	Đôi	0,100
27	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
28	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
29	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
30	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
31	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
32	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys Anti-HBe - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm xác định HBeAb

1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là Anti-HBe
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có).

3. Kết quả và báo cáo

- Mẫu huyết thanh: Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên số đo của Cal1 và Cal2. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).
 - + Nếu $COI < 1$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với Anti-HBe.
 - + Nếu $COI \geq 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với Anti-HBe.

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).
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

92. HBV đo tải lượng Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Đo số lượng bản sao HBV DNA trong một đơn vị thể tích huyết thanh hoặc huyết tương (copies/ml).

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dung cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl – 1000 µl.

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 10 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
9	Găng không có bột tal	Đôi	0,500
10	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	0,400
12	Kít tách DNA	Test	1,400
13	HBV Standard	Bộ	1,200
14	EQAS (nếu thực hiện)*		0,02
15	Ependoff 1,7ml	Tube	2,200
16	Ependoff 0,2ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
31	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
32	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
33	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
34	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
35	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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, 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.

1. Lấy bệnh phẩm

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem phụ lục 3)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm HBV Real-time Quant (VD)

2.1. Tách chiết DNA

2.2. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần
- Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube HBV qPCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR cùng với 1 bộ standard.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” cho standard. Màu “FAM” và “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính hoặc âm tính
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính

2. Phân tích standard

- Hệ số tuyến tính (R^2) phải nằm trong khoảng 0.960-1.000, tốt nhất 0.990-1.000.
- Hiệu suất nhân bản (PCR efficiency) phải nằm trong khoảng 90-115%, tốt nhất 95-110%.
- Hệ số dốc (Slope) phải nằm trong khoảng -3 đến -4, tốt nhất -3.3 đến -3.6.

3. Phân tích mẫu

- Ngưỡng phát hiện của bộ kit là 3×10^2 copies/ml

- Những mẫu dương tính chỉ cần chọn màu FAM để phân tích

Các kết quả dương tính được nhân với hệ số pha loãng tùy thuộc vào loại kit tách chiết DNA sẽ thu được kết quả hàm lượng virus/ml máu (copies/ml), do đó kết quả sau khi nhân:

+ Nếu $\geq 3 \times 10^2$ thì kết luận “Mẫu dương tính: a copies/ml”

+ Nếu $< 3 \times 10^2$ thì kết luận “Mẫu dương tính dưới ngưỡng định lượng”.

- Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự.

4. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân: Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

93. HBV đo tải lượng hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Đếm số lượng bản copies của HBV DNA trong một đơn vị thể tích (ml) huyết tương.

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Hệ thống máy tách chiết tự động (RNA, DNA) và định lượng COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan 48 Analyzer (Roche) (VD hoặc tương đương)
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 10 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	3,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng.	Test	0,340
11	SPU	Cái	1,300
12	Tube-S	Cái	1,300
13	Tube-K	Cái	1,300
14	Tip-K	Cái	1,300
15	Kit CAP-G/CTM Wash Reagent 5.1 L	test	1,300
16	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
17	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,000
18	Đầu cân có lọc 1000 µl (DNAase- RNAase free)	Cái	1,3 00
19	Giấy thấm	Cuộn	0,100
20	Giấy xét nghiệm	Tờ	3,000
21	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
22	Bút viết kính	Cái	0,020
23	Bút bi	Cái	0,010
24	Mũ	Cái	0,020
25	Khẩu trang	Cái	0,020
26	Găng không có bột tal	Đôi	0,100
27	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
28	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
29	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
30	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
31	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
32	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 của người 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 3)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan HBV Test 2.0 (Roche Diagnostics GmbH) (VD)

2.1. Tách chiết DNA vận hành máy COBAS AmpliPrep (thực hiện theo quy trình hướng dẫn máy của nhà sản xuất)

2.2. Khuếch đại DNA, đọc kết quả trên máy COBAS TaqMan 48 (thực hiện theo quy trình hướng dẫn máy của nhà sản xuất)

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Kiểm tra chất lượng

Giá trị định lượng chấp nhận được nêu :

- Chứng âm là không phát hiện.
- Chứng nội cho giá trị Ct mong đợi.

Không nhận các kết quả của chứng không có giá trị khi xuất hiện thông báo lỗi :

- Chứng âm: Invalid (không giá trị)
- Chứng dương thấp: Invalid, $< 2.00E+01$ IU/ml, $> 1.70E+08$ IU/ml, không phát hiện (Target Not Detected)
- Chứng dương cao: Invalid, $< 2.00E+01$ IU/ml, $> 1.70E+08$ IU/ml, không phát hiện (Target Not Detected)

2. Kết quả và báo cáo

Kết quả định lượng HBV DNA của máy COBAS TaqMan 48 được tính theo đơn vị quốc tế (IU), quy đổi ra số copies/ml theo công thức tính toán của máy đã được thiết lập dựa theo quy chuẩn của WHO.

$$1\text{IU} = 5,82\text{copies}$$

Giá trị tham số Ct (được định nghĩa là số chu kỳ ngưỡng tại đó huỳnh quang vượt ngưỡng cố định, để so sánh với chu kỳ ngưỡng của mẫu chứng chuẩn từ đó suy ra số lượng DNA mẫu đưa vào phản ứng) cho HBV DNA và HBV QS DNA.

Các giá trị chứng của HBV có nồng độ trong giới hạn được thực hiện đồng thời với mẫu bệnh phẩm để thiết lập đường chuẩn, cho thấy mối tương quan giữa giá trị Ct và số log cp/ml.

Giá trị trên máy	Trả lời kết quả
Target Not Detected	Không phát hiện thấy HBV DNA
$< 2.00E+01$ IU/ml	< 116 cp/ml
$\geq 2.00E+01$ IU/ml đến $\leq 1.70E+08$ IU/ml	nhận những kết quả trong giới hạn này ≥ 116 cp /ml đến $\leq 9.89 \times 10^8$ cp/ml
$> 1.70E+08$ IU/ml	$> 9.89 \times 10^8$ cp/ml
Invalid	Không giá trị , chạy lại mẫu bệnh phẩm

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Việc lấy mẫu máu, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

94. HBV genotype PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để xác định genotype của HBV (virus viêm gan B)

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật PCR

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001

5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	EQAS (nếu thực hiện) *		0,020
12	Kit tách chiết DNA từ virus	Test	2,350
13	DNA marker	Bộ	1,000
14	Primer 1-1 xác định genotype A	ml	0,0001
15	Primer 1-2 xác định genotype A	ml	0,0001
16	Primer 2-1 xác định genotype B	ml	0,0001
17	Primer 2-2 xác định genotype B	ml	0,0001
18	Primer 3-1 xác định genotype C	ml	0,0001
19	Primer 3-2 xác định genotype C	ml	0,0001
20	Primer 4-1 xác định genotype D	ml	0,0001
21	Primer 4-2 xác định genotype D	ml	0,0001
22	Primer 5-1 xác định genotype E	ml	0,0001
23	Primer 5-2 xác định genotype E	ml	0,0001
24	Primer 6-1 xác định genotype F	ml	0,0001
25	Primer 6-2 xác định genotype F	ml	0,0001
26	Primer 7-1 xác định genotype G	ml	0,0001
27	Primer 7-2 xác định genotype G	ml	0,0001
28	Primer 8-1 xác định genotype H	ml	0,0001
29	Primer 8-2 xác định genotype H	ml	0,0001
30	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3.000
31	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
32	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
33	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
34	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
35	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
36	Ethanol BDH	ml	0,500
37	Water-DEPC Treated	ml	2,000
38	Thạch	Gam	0,075
39	Ladder	ml	0,0025
40	Blue Juice Gel loading dye	ml	0,003
41	Ethidium Bromide	ml	0,100
42	TAE Buffer	ml	0,100
43	Giấy thấm	Cuộn	0,100
44	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
45	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
46	Bút viết kính	Cái	0,020
47	Bút bi	Cái	0,010

48	Mũ	Cái	0,020
49	Khẩu trang	Cái	0,020
50	Găng tay	Đôi	0,100
51	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
52	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
53	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
54	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
55	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
56	Khăn lau tay	cái	0,010

* 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, 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 3)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA tổng số

2.2. Thực hiện PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Đánh giá 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 và có kích thước phù hợp tương ứng với thang DNA chuẩn.

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 xét nghiệm.

95. HBV genotype Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định genotype của virus viêm gan B (HBV) trong máu.

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dung cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 1 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
9	Găng không có bột tal	Cái	0,500
10	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng	Test	2,000
12	Kít tách DNA	Test	3,000
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Ependoff 1,7ml	Tube	3,000
15	Ependoff 0,2ml	Tube	3,000
16	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	3,000
17	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
18	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
19	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,000
20	Ethanol BDH	ml	2,000
21	Water-DEPC Treated	ml	2,000
22	Giấy thấm	Cuộn	0,100
23	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
25	Bút viết kính	Cái	0,020
26	Bút bi	Cái	0,010
27	Mũ	Cái	0,020
28	Găng tay	Đôi	0,100
29	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
30	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
31	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
32	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
33	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
34	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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, 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.

1. Lấy bệnh phẩm

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem phụ lục 3)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm HBV genotype

2.1. Tách chiết DNA

2.2. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube HBV Genotype A rPCR Mix, HBV Genotype B rPCR Mix và HBV Genotype C rPCR Mix
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” cho tất cả các mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM tuyến tính vượt quá tín hiệu nền với cả 3 genotype.
- Chứng âm có đường biểu diễn thẳng và không vượt qua tín hiệu nền.

2. Phân tích mẫu

- Mẫu có đường biểu diễn dương tính tại vị trí tương ứng với genotype nào thì kết luận mẫu nhiễm genotype đó. Một mẫu có thể đồng nhiễm nhiều genotype.
- Mẫu có đường biểu diễn âm tính với tất cả các genotype thì kết luận: “Mẫu nhiễm HBV genotype khác ngoài 3 genotype A, B, C” (vì mẫu đã được xác định dương tính với HBV trước đó).

3. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Tất cả các mẫu đều dương tính kể cả chứng âm.

- **Nguyên nhân 1:** Lô thí nghiệm bị ngoại nhiễm DNA hoặc sản phẩm PCR từ môi trường của khu vực thao tác hoặc nhiễm chéo giữa các mẫu.

Khắc phục: Chiếu UV và vệ sinh khu vực thao tác bằng nước Javel để khử nhiễm. Tiến hành lại thí nghiệm thật cẩn thận.

- **Nguyên nhân 2:** Kit bị ngoại nhiễm DNA hoặc sản phẩm PCR trong quá trình sử dụng.

Khắc phục: Thay kit mới và thực hiện quá trình như hướng dẫn ở nguyên nhân 1.

Trường hợp này không thể lấy kết quả, phải khắc phục và tiến hành lại thí nghiệm.

96. HBV genotype giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định genotype HBV (virus viêm gan B)

2. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide của gen đặc trưng cho HBV.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001

7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột tal (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA từ virus	Test	2,350
12	EQAS (nếu thực hiện) *		0,020
13	DNA marker	Bộ	1,000
14	Primer 1 (vòng 1)	ml	0,0001
15	Primer 2 (vòng 1)	ml	0,0001
16	Primer 3 (vòng 2)	ml	0,0001
17	Primer 4 (vòng 2)	ml	0,0001
18	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
19	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
20	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
21	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
22	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
23	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
24	Ethanol BDH	ml	0,500
25	Water-DEPC Treated	ml	2,000
26	Thạch	Gam	0,075
27	Ladder	ml	0,0025
28	Blue Juice Gel loading dye	ml	0,003
29	Ethidium Bromide	ml	0,100
30	TAE Buffer	ml	0,100
31	Giấy thấm	Cuộn	0,100
32	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
34	Bút viết kính	Cái	0,020
35	Bút bi	Cái	0,010
36	Mũ	Cái	0,020
37	Khẩu trang	Cái	0,020
38	Găng tay	Đôi	0,100
39	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
40	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
41	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
42	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
43	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
44	Khăn lau tay	cái	0,010

* 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 tương, huyết thanh

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 3 ml máu vào ống lấy máu vô trùng có chất chống đông EDTA.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA 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 của HBV trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 gen đích phải có độ tương đồng $\geq 90\%$ mới có thể kết luận được genotype của HBV

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 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.

97. HBV kháng thuốc Real-time PCR (Cho 1 loại thuốc)

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định các nucleotide bị thay đổi trên hệ gen của HBV có liên quan đến kháng thuốc.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy Real-time PCR
- Máy in màu
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001

6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	EQAS (nếu thực hiện) *		0,020
12	Kit tách chiết DNA từ virus	Test	2,350
13	DNA marker	Bộ	1,000
14	Primer 1	ml	0,0001
15	Primer 2	ml	0,0001
16	Probe	ml	0,0001
17	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
18	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
19	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
20	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
21	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
22	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
23	Ethanol BDH	ml	0,500
24	Water-DEPC Treated	ml	2,000
25	Giấy thấm	Cuộn	0,100
26	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
27	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
28	Bút viết kính	Cái	0,020
29	Bút bi	Cái	0,010
30	Mũ	Cái	0,020
31	Khẩu trang	Cái	0,020
32	Găng tay	Đôi	0,100
33	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
34	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
35	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
36	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
37	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
38	Khăn lau tay	cái	0,010

* 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, 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 3)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

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

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Chứng Dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản, chứng Âm phải 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 positive control (PC) và negative control (NC) xuất hiện không đúng với diễn giải ở phần IV thì phải kiểm tra lại Master mix và chứng dương và quá trình tách DNA tổng số, và thực hiện lại 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.

98. HBV kháng thuốc giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự thay đổi trình tự nucleotide trên hệ gen của HBV có liên quan đến kháng thuốc.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật giải trình tự nucleotide.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001

7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	EQAS (nếu thực hiện) *		0,020
12	Kit tách chiết DNA từ virus	Test	2,350
13	DNA marker	Bộ	1,000
14	Primer 1 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 2 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Primer 3 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
17	Primer 4 (bộ primer đặc hiệu)	ml	0,0001
18	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
19	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
20	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
21	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
22	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
23	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
24	Ethanol BDH	ml	0,500
25	Water-DEPC Treated	ml	2,000
26	Thạch	Gam	0,075
27	Ladder	ml	0,0025
28	Blue Juice Gel loading dye	ml	0,003
29	Ethidium Bromide	ml	0,100
30	TAE Buffer	ml	0,100
31	Giấy thấm	Cuộn	0,100
32	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
34	Bút viết kính	Cái	0,020
35	Bút bi	Cái	0,010
36	Mũ	Cái	0,020
37	Khẩu trang	Cái	0,020
38	Găng tay	Đôi	0,100
39	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
40	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
41	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
42	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
43	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
44	Khăn lau tay	cái	0,010

* 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, tổ chức sinh thiết.

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 3 ml máu vào ống lấy máu vô trùng có chất chống đông EDTA.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA 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 phân tích trình tự gen kháng thuốc của HBV trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 gen không bị nhiễu và phải cho thấy có sự thay đổi một số vị trí nucleotide trên gen tương ứng với các loại thuốc điều trị HBV

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 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.

99. HCV Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HCV Ab trong máu

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Micropipet 100µ, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 25 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,200
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,030
7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,030

8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	2,000
10	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,000
11	Đầu cân 200 µl	Cái	1,050
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm MONOLISA Anti – HCV PLUS Bio-Rad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti HCV
1	Chuẩn bị sinh phẩm, sơ đồ nhỏ mẫu
2	Nhỏ dung dịch pha loãng
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm theo thứ tự hướng dẫn
4	Đậy nắp phản ứng và ủ ở nhiệt độ và trong thời gian quy định theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất
5	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn

	của nhà sản xuất
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng
7	ủ ở nhiệt độ phòng ($18^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) theo hướng dẫn.
8	Rửa phiên nhựa và làm khô
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề tẩm phản ứng trong tối theo quy trình ở nhiệt độ phòng ($18^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$) như hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện

PC: Độ hấp phụ của chứng dương (R4)

PCx: Giá trị OD trung bình của chứng dương

CO: Giá trị ngưỡng

$$\text{PCx} = \frac{\text{Tổng số OD của chứng dương}}{3}$$

$$1.000 \leq \text{PC} \leq 2.400$$

$$\text{NC} < 0,15$$

Loại chứng dương PC có giá trị cao hơn 30% so với giá trị PCx. Tiếp tục tính kết quả theo 2 chứng dương còn lại.

$$\text{CO} = \frac{\text{PCx}}{5}$$

3. Nhận định, trả lời kết quả

- Mẫu huyết thanh:

Mẫu huyết thanh có $\text{OD} < \text{CO}$ được coi là âm tính.

Cần thận trọng trong trường hợp mẫu huyết thanh có $\text{CO} - 10\% < \text{OD} < \text{CO}$. Trường hợp này phải được xét nghiệm lại.

Mẫu huyết thanh có $\text{OD} \geq \text{CO}$ cần được xét nghiệm lại.

+ Nếu lần 2 hoặc lần 3 có $\text{OD} \geq \text{CO}$, mẫu được coi là dương tính.

+ Nếu 2 lần đều có $\text{OD} < \text{CO}$, mẫu được coi là âm 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.
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) ,
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

100. HCV Ab miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HCV Ab trong máu.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Micropipet thể tích 50 μl - 200 μl

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 15 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm	Test	0,150

	tra chất lượng		
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,010
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,010
14	Chứng nội kiểm	Test	0,100
15	Ngoại kiểm (nếu có)*	ml	0,020
16	Cleancell M	ml	3,000
17	Procell M	ml	3,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	Chiếc	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	Chiếc	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* Ghi chú: Chi phí ngoại kiểm cho quy trình kỹ thuật được tính cụ thể theo Chương trình ngoại kiểm (EQAS) mà 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys Anti-HCV - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm xác định Anti-HCV
1	Pha thuốc thử trước khi sử dụng, tránh tạo bọt
2	Ủ lọ thuốc thử đã được hồi chỉnh trong thời gian quy định ở thích hợp theo hướng dẫn và kết thúc quá trình hồi chỉnh. Có thể lưu lọ thuốc thử đã hồi chỉnh qua đêm ở nhiệt độ thích hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
3	Nạp thuốc thử vào khay chứa thuốc thử
4	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
5	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
6	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là anti-HCV
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh cần chạy vào Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm vào hệ thống LIS
2	Đặt ống máu dán barcode vào rack đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có)

3. Kết quả và báo cáo

- Mẫu huyết thanh: Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên số đo của Cal1 và Cal2. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

Kết quả được diễn giải như sau:

- Nếu $COI < 0.90$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với anti-HCV.
- Nếu $0.90 \leq COI \leq 1.0$: mẫu bệnh phẩm này nằm trong giới hạn nghi ngờ, cần phải kiểm tra lại.

- Nếu $COI > 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với anti-HCV.
- Đối với những mẫu được kiểm tra lại lần 2:
 - + Nếu $COI < 0.90$ thì kết luận âm tính.
 - + Nếu $COI \geq 0.90$ giống như lần đầu thì kết luận dương tính.

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).
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

101. HCV Ag/Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên, kháng thể HCV Ag/Ab trong máu.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipet vi lượng 100 μl , 1000 μl .
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 20 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,200
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,030
7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,030

8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	2,000
10	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,000
11	Đầu cân 200 µl	Cái	1,050
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm MONOLISA HCV Ag-Ab ULTRA Bio-Rad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti HCV
1	Chuẩn bị sinh phẩm, sơ đồ nhỏ mẫu
2	Nhỏ dung dịch cộng hợp 1
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm hoặc mẫu ngoại kiểm (nếu có) theo thứ tự hướng dẫn.
4	Đậy nắp phản ứng và ủ ở nhiệt độ và trong thời gian quy định theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất

5	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất
6	Nhỏ dung dịch cộng hợp 2 vào các giếng theo hướng dẫn.
7	Ủ ở nhiệt độ và thời gian theo hướng dẫn.
8	Rửa phiến nhựa và làm khô
9	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề tấm phản ứng trong tối theo quy trình ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) trong thời gian như hướng dẫn của nhà sản xuất.
10	Dừng phản ứng
11	Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm bằng máy đo mật độ quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện

PC Ab: Độ hấp phụ của chứng dương Ab

PC Ag: Độ hấp phụ của chứng dương Ag

PCx: Giá trị OD trung bình của chứng dương Ab

CO: Giá trị ngưỡng

$$PCx = \frac{\text{Tổng số OD của chứng dương}}{3}$$

$$NC < 0,6 \times CO$$

$$0.800 \leq PC \text{ Ab} \leq 2.400$$

$$PC \text{ Ag} > 0,500$$

Loại chứng dương PC có giá trị cao hơn 30% so với giá trị PCx. Tiếp tục tính kết quả theo 2 chứng dương còn lại.

$$CO = \frac{PCx}{4}$$

2. Nhận định, trả lời kết quả

Mẫu huyết thanh:

Mẫu huyết thanh có OD < CO được coi là âm tính.

Cần thận trọng trong trường hợp mẫu huyết thanh có CO -10% < OD < CO. Trường hợp này phải được xét nghiệm lại.

Mẫu huyết thanh có OD ≥ CO cần được xét nghiệm lại.

+ Nếu lần 2 hoặc lần 3 có OD ≥ CO, mẫu được coi là dương tính.

+ Nếu 2 lần đều có OD < CO, mẫu được coi là âm 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.
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) ,
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

102. HCV Core Ag miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện và định lượng HCV Core Ag trong máu.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CMIA (phản ứng hóa phát quang được tính bằng đơn vị ánh sáng tương đương RLU) với quy trình xét nghiệm linh hoạt Chemiflex.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Micropipet thể tích 50 μl - 200 μl

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 15 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000

10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,150
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,010
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,010
14	HCV Ag Calibrators	ml	0,050
15	HCV Ag Controls	ml	0,200
17	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
18	Pre-trigger solution	ml	3,000
19	Trigger solution	ml	3,000
20	Wash Buffer	ml	2,000
21	Reaction Vessel	Cái	1,000
22	Sample Cup	Cái	1,000
23	Septum	Cái	0,050
24	Replacement Cap	Cái	0,001
25	Nước cất 2 lần	ml	5,000
26	Giấy thấm	Cuộn	0,100
27	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
28	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
29	Bút viết kính	Cái	0,020
30	Bút bi	Cái	0,010
31	Mũ	Cái	0,020
32	Khẩu trang	Cái	0,020
33	Găng tay	Đôi	0,100
34	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
35	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
36	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
37	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
38	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
39	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm ARCHITECT HCV Ag - Abbott (VD)

Các bước	Xét nghiệm xác định HCV Core Ag
1	Máy ở chế độ READY Nạp bộ thuốc thử ARCHITECT HCV Ag vào hệ thống (lắc chai Vi hạt để phân tán các vi hạt có thể bị lắng trong quá trình vận chuyển). • Lắc đảo ngược chai vi hạt để được phân tán hoàn toàn. • Đặt septum lên chai. Nạp thuốc thử vào khay, chai thuốc thử đã mở nắp đều có septum đầy lại
2	Vào màn hình chính, chọn Reagent → Reagent Status kiểm tra số lượng tests. Kiểm tra Cal Status của hộp thuốc thử ở chế độ Active.
3	Vào Supply → Supply Status kiểm tra các vật tư tiêu hao và dung dịch chạy máy.
4	Chuyển máy sang chế độ RUNNING
5	Tiến hành chạy mẫu chứng (control). Tham khảo quy trình chạy mẫu chứng
6	Chạy mẫu bệnh phẩm theo các bước sau: Ly tâm máu người bệnh 3000 vòng trong 10 phút.
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Cho trực tiếp ống máu vào Sample Carrier
2	Vào màn hình Order → Patient Order
3	Nhập mã Carrier, mã bệnh phẩm
4	Chọn Test HCV Ag
5	Chọn Add Order
6	Đưa Carrier vào bộ phận nạp mẫu trên máy
Chạy mẫu dùng barcode	
1	Nhập chỉ định định xét nghiệm trên máy tính (hệ thống LIS)
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào Carrier, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào bộ phận nạp mẫu

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy mẫu chứng mỗi khi mở một hộp kit mới, ít nhất 24 giờ một lần trước khi chạy test và sau mỗi lần chạy chuẩn.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và có thể có sự thay đổi về giới hạn chứng. Vì vậy khi nhận một lô control mới, cần kiểm tra “Bảng giá trị” của nhà sản xuất

xem có phải thay đổi lại giá trị chứng hay không. Nếu cần thì phải nhập lại số liệu bằng tay để cập nhật giá trị chứng mới.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có)

3. Kết quả và báo cáo

- Xét nghiệm ARCHITECT HCV Ag sử dụng phương pháp rút giảm số liệu cho phù hợp với đường cong Logistic 4 Thông số (gọi tắt là 4PLC, theo trục Y) để vẽ đường cong hiệu chuẩn.

- Mẫu có nồng độ < 3.00 fmol/L được xem là không phản ứng với HCV Ag.

+ Mẫu có nồng độ ≥ 3.00 fmol/L được xem là có phản ứng với HCV Ag.

+ Mẫu có nồng độ ≥ 3.00 fmol/L và < 10.00 fmol/L nên được làm lại 2 lần.

+ Nếu cả hai lần chạy lại xét nghiệm đều cho kết quả không phản ứng, mẫu được xem là không phản ứng với HCV Ag.

+ Nếu một trong hai kết quả xét nghiệm chạy lại ≥ 3.00 fmol/L, mẫu được xem là phản ứng lặp lại với HCV Ag, là kết quả định lượng ban đầu được sử dụng làm kết quả báo cáo cuối cùng.

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).

- Trước khi nạp bộ thuốc thử ARCHITECT HCV Ag vào hệ thống lần đầu tiên, lắc chai Vi hạt để phân tán các vi hạt có thể bị lắng trong quá trình vận chuyển.

- 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.

- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

103. HCV PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của HCV (virus viêm gan C)

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý kỹ thuật RT-PCR

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Bể điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 2 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001

6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	EQAS (nếu thực hiện) *		0,020
12	Kit tách ARN từ virus	Test	2,350
13	DNA marker	Bộ	1,000
14	Primer 1-1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 1-2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Primer 2-1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
17	Primer 2-2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
18	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
19	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
20	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
21	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
22	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
23	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
24	Ethanol BDH	ml	0,500
25	Water-DEPC Treated	ml	2,000
26	Thạch	Gam	0,075
27	Ladder	ml	0,0025
28	Blue Juice Gel loading dye	ml	0,003
29	Ethidium Bromide	ml	0,100
30	TAE Buffer	ml	0,100
31	Giấy thấm	Cuộn	0,100
32	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
34	Bút viết kính	Cái	0,020
35	Bút bi	Cái	0,010
36	Mũ	Cái	0,020
37	Khẩu trang	Cái	0,020
38	Găng tay	Đôi	0,100
39	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
40	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
41	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
42	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
43	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
44	Khăn lau tay	cái	0,010

* 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, huyết tương, tổ chức sinh thiết

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 3)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết ARN tổng số

2.2. Thực hiện RT-PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Đánh giá 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 và có kích thước tương ứng với thang DNA chuẩn.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

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

104. HCV đo tải lượng Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định số lượng bản sao của virus viêm gan C (HCV) trong một đơn vị thể tích máu (copies/ml).

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dung cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl – 1000 µl.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 8 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
9	Găng không có bột tal	Cái	0,500
10	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,400
12	Kít tách ARN	Test	1,400
13	cDNA	Test	1,400
14	HCV Standard	Bộ	0,200
15	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
16	Ependoff 1,7ml	Tube	2,000
17	Ependoff 0,2ml	Tube	1,000
18	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,100
19	Đầu côn 30 µl	Cái	1,100
20	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
21	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	2,200
22	Ethanol BDH	ml	0,250
23	Water-DEPC Treated	ml	2,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
36	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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, 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.

1. Lấy bệnh phẩm

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem phụ lục 3)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm HCV qPCR (VD)

2.1. Tách chiết RNA

2.2. Thực hiện phản ứng RT-PCR

Thực hiện bước này với các tube RT-Mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.

- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch RNA tách chiết vào tube.
- Lập chương trình cho máy PCR hoạt động
- Sản phẩm cDNA được dùng để thực hiện phản ứng PCR.
- Nếu chưa thực hiện phản ứng PCR ngay, phải bảo quản cDNA ở -20°C.

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. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho cDNA từ phản ứng RT ở trên vào từng tube HCV qPCR Mix. Sau đó đặt các tube vào máy real-time PCR cùng với 1 bộ standard.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” cho standard. Màu “FAM” và “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

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

2. Phân tích standard

- Hệ số tuyến tính (R^2) phải nằm trong khoảng 0.960-1.000, tốt nhất 0.990-1.000.
- Hiệu suất nhân bản (PCR efficiency) phải nằm trong khoảng 90-115%, tốt nhất 95-110%.
- Hệ số dốc (Slope) phải nằm trong khoảng -3 đến -4, tốt nhất -3.3 đến -3.6.

3. Phân tích mẫu

- Ngưỡng phát hiện của bộ kit là 3×10^2 copies/ml
- Những mẫu dương tính chỉ cần chọn màu FAM để phân tích

Các kết quả dương tính được nhân với hệ số pha loãng sẽ thu được kết quả hàm lượng virus/ml máu (copies/ml), do đó kết quả sau khi nhân:

- + Nếu $\geq 3 \times 10^2$ thì kết luận “Mẫu dương tính: a copies/ml”
 - + Nếu $< 3 \times 10^2$ thì kết luận “Mẫu dương tính dưới ngưỡng định lượng”.
- Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự.

4. In đồ thị kết quả.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân: Có thể mẫu âm thực sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.
- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

105. HCV đo tải lượng hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Đếm số lượng bản copies của HCV RNA trong một đơn vị thể tích huyết thanh hoặc huyết tương (ml).

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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.

2.2. Trang thiết bị

- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Hệ thống máy tách chiết tự động (RNA, DNA) và định lượng COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan 48 Analyzer (Roche) (VD)
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 10 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	3,000

9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng.	Test	0,300
11	SPU	Cái	1,300
12	Tube-S	Cái	1,300
13	Tube-K	Cái	1,300
14	Tip-K	Cái	1,300
15	Kit CAP-G/CTM Wash Reagent 5.1 L	ml	1,300
16	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
17	Đầu côn 1000 µl	Cái	1,000
18	Đầu côn có lọc 1000 µl	Cái	1,300
19	Giấy thấm	Cuộn	0,100
20	Giấy xét nghiệm	Tờ	3,000
21	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
22	Bút viết kính	Cái	0,020
23	Bút bi	Cái	0,010
24	Mũ	Cái	0,020
25	Khẩu trang	Cái	0,020
26	Găng không có bột tal (DNAase/ARNase free)	Đôi	0,100
27	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
28	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
29	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
30	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
31	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
32	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 hoặc huyết thanh của người 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 3)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan HCV Test (Roche Diagnostics GmbH) (VD)

2.1. Tách chiết RNA vận hành máy COBAS AmpliPrep

2.2. Phiên mã ngược RNA thành cDNA, khuếch đại cDNA, đọc kết kết trên máy COBAS TaqMan 48

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Kiểm tra chất lượng

Giá trị định lượng chấp nhận được nếu:

Giá trị định lượng chấp nhận được nếu:

- Chứng âm là không phát hiện.
- Chứng nội cho giá trị Ct mong đợi.

Không nhận các kết quả của chứng không có giá trị khi xuất hiện thông báo lỗi :

- Chứng âm: Invalid
- Chứng dương thấp: Invalid, $< 1.50E+01$ IU/ml, $> 6.90E+07$ IU/ml, không phát hiện (Target not detected)
- Chứng dương cao: Invalid, $< 1.50E+01$ IU/ml, $> 6.90E+07$ IU/ml, không phát hiện (Target not detected)

2. Kết quả và báo cáo

Kết quả định lượng HCV RNA của máy COBAS TaqMan 48 được tính theo đơn vị quốc tế (IU), quy đổi ra số copies/ml theo công thức tính toán của máy đã được thiết lập dựa theo quy chuẩn của WHO.

1IU = 2,5copies

Giá trị tham số Ct (được định nghĩa là số chu kỳ ngưỡng tại đó huỳnh quang vượt ngưỡng cố định, để so sánh với chu kỳ ngưỡng của mẫu chứng chuẩn từ đó suy ra số lượng RNA mẫu đưa vào phản ứng) cho HCV RNA và HCV QS RNA.

Các giá trị chứng của HCV có nồng độ trong giới hạn được thực hiện đồng thời với mẫu bệnh phẩm để thiết lập đường chuẩn, cho thấy mối tương quan giữa giá trị Ct và số log cp/ml.

Giá trị trên máy	Trả lời kết quả
Target Not Detected	Không phát hiện thấy HCV RNA
$< 1.50E+01$ IU/ml	< 37 cp/ml)
$\geq 1.50E+01$ IU/ml đến $\leq 6.90E+07$ IU/ml	nhận những kết quả trong giới hạn này ≥ 37 cp/ml đến $\leq 1.70 \times 10^8$ cp/ml
$> 6.90E+07$ IU/ml	$> 1.70 \times 10^8$ cp/ml
Invalid	Không giá trị, chạy lại mẫu bệnh phẩm

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

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

Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

106. HCV genotype Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định genotype của virus viêm gan C

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C) (nếu có)
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl – 1000 µl.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 1 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
9	Găng không có bột tal	Đôi	0,500
10	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng	Test	1,000
12	Kít tách ARN	Test	2,000
13	cDNA	Test	2,000
15	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
16	Ependoff 1,7ml	Tube	2,000
17	Ependoff 0,2ml	Tube	1,000
18	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,100
19	Đầu côn 30 µl	Cái	1,100
20	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
21	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	2,200
22	Ethanol BDH	ml	0,250
23	Water-DEPC Treated	ml	2,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
36	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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, 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.

1. Lấy bệnh phẩm

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem phụ lục 3)

- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm HCV genotype (VD)

2.1. Tách chiết RNA

2.2. Thực hiện phản ứng RT-PCR

- Thực hiện bước này với các tube RT-Mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch RNA tách chiết vào tube.
- Lập chương trình cho máy PCR hoạt động
- Sản phẩm cDNA được dùng để thực hiện phản ứng PCR.
- Nếu chưa thực hiện phản ứng PCR ngay, phải bảo quản cDNA ở (-20°C).

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. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho cDNA từ phản ứng RT ở trên (hoặc cDNA của mẫu dương tính trước đó) vào từng tube HCV Genotype 1-6 rPCR Mix và HCV Genotype 2-3 rPCR. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “HEX” cho tất cả các mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính.
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn dương tính của màu FAM với genotype 2-6 và màu HEX với genotype 1-3.
- Chứng âm có đường biểu âm tính với cả 2 màu.

2. Phân tích mẫu

- Trong tube HCV Genotype 1-6 rPCR Mix, probe phát hiện genotype 1 được đánh dấu với màu HEX, probe phát hiện genotype 6 được đánh dấu với màu FAM. Trong tube HCV Genotype 2-3 rPCR Mix, probe phát hiện

genotype 2 được đánh dấu với màu FAM, probe phát hiện genotype 3 được đánh dấu với màu HEX.

- Chọn cả màu FAM và HEX. Mẫu có đường biểu diễn dương tính tương ứng với genotype nào thì kết luận mẫu nhiễm genotype đó. Một mẫu có thể đồng nhiễm nhiều genotype.

3. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Tất cả các mẫu đều dương tính kể cả chứng âm.

1. Nguyên nhân 1: Lô thí nghiệm bị ngoại nhiễm RNA hoặc sản phẩm PCR từ môi trường của khu vực thao tác hoặc nhiễm chéo giữa các mẫu.

Khắc phục: Chiếu UV và vệ sinh khu vực thao tác bằng nước Javel để khử nhiễm. Tiến hành lại thí nghiệm thật cẩn thận.

2. Nguyên nhân 2: Kit bị ngoại nhiễm RNA hoặc sản phẩm PCR trong quá trình sử dụng.

Khắc phục: Thay kit mới và thực hiện quá trình như hướng dẫn ở nguyên nhân Trường hợp này không thể lấy kết quả, phải khắc phục và tiến hành lại thí nghiệm.

107. HCV genotype giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định genotype của HCV

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật giải trình tự nucleotide trên gen đặc trưng của virus viêm gan C.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001

5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	EQAS (nếu thực hiện) *		0,020
12	Kit tách chiết ARN từ virus	Test	2,350
13	DNA marker	Bộ	1,000
14	Primer 1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Primer 3 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
17	Primer 4 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
18	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
19	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
20	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
21	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
22	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
23	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
24	Ethanol BDH	ml	0,500
25	Water-DEPC Treated	ml	2,000
26	Thạch	Gam	0,075
27	Ladder	ml	0,0025
28	Blue Juice Gel loading dye	ml	0,003
29	Ethidium Bromide	ml	0,100
30	TAE Buffer	ml	0,100
31	Giấy thấm	Cuộn	0,100
32	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
34	Bút viết kính	Cái	0,020
35	Bút bi	Cái	0,010
36	Mũ	Cái	0,020
37	Khẩu trang	Cái	0,020
38	Găng tay	Đôi	0,100
39	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
40	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
41	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
42	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
43	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
44	Khăn lau tay	cái	0,010

* 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, huyết tương hoặc tổ chức sinh thiết

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 3)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện RT-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 của HCV trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 gen đích không bị nhiễu và phải có độ tương đồng $\geq 90\%$ mới có thể kết luận được genotype của HCV

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 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.

108. HAV IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HAV IgM trong máu

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Micropipet 100 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khâu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,600
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,033
7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,033
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	2,000

10	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,000
11	Đầu cân 200 µl	Cái	3,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm ETI – HA – IGMK PLUS DiaSorin (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HAV IgM
1	Chuẩn bị sinh phẩm, sơ đồ nhỏ mẫu Chuẩn bị dung dịch rửa
2	Pha loãng bệnh phẩm trong dung dịch pha loãng bệnh phẩm theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
3	Nhỏ chứng và bệnh phẩm theo thứ tự hướng dẫn
4	Ủ tấm phản ứng ở nhiệt độ và trong thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Chuẩn bị dung dịch cộng hợp theo hướng dẫn

6	Rửa khay phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
7	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng theo hướng dẫn
8	Ủ ở nhiệt độ và trong thời gian theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
9	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn
10	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (15 ⁰ C -30 ⁰ C) tránh ánh sáng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
11	Dừng phản ứng
12	Đọc KQ ở bước sóng 450/630 nm bằng máy đo mật độ quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện

- Giếng trắng (Blank): $0.000 \leq \text{BLK} \leq 0.150$
- Giá trị trung bình của Cal: $-0.020 < \text{Cal } \bar{x} < 0.120$
- Giá trị của Cal: $-0.020 < \text{Cal} < 0.120$
- Giá trị chứng âm (NC): $-0.020 < \text{NC} < 0.120$
- Giá trị chứng dương (PC): $0.5 < \text{PC} < 2.5$
 $\text{PC} - \text{NC} > 0.380$

2. Kết quả và báo cáo

- **Tính giá trị ngưỡng Cut-off value (CO)**

$$\text{CO} = \text{Cal } \bar{x} + 0.100$$

- **Giá trị của thử nghiệm:**

Tính tỉ số mẫu:

$$\text{Tỉ số mẫu} = \text{OD mẫu} / \text{CO}$$

Giải thích kết quả

- Các mẫu có tỉ số mẫu nhỏ hơn 0,8 được coi là âm tính với HAV IgM.
- Các mẫu có tỉ số mẫu > 1.2 được coi là dương tính với HAV IgM.
- Các mẫu nằm trong khoảng từ 0.8 đến 1.2 so với giá trị của CO phải được kiểm tra lại.

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.

- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) ,
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

109. HAV IgM miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HAV IgM trong máu.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD)

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (
- -20°C) (nếu có).
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Micropipet có thể tích 50 μl - 200 μl

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 5 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000

10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,400
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,005
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,005
14	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
15	Cleancell M	ml	3,000
16	Procell M	ml	3,000
17	Probe Wash M	ml	2,000
18	Preclean M	ml	2,000
19	Assay Tip/Cup E170	chiếc	3,000
20	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
21	Nước cất	ml	5,000
22	Control	Test	0,100
23	Sample cup	Chiếc	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)

- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys HAV IgM - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HAV IgM
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là HAV IgM
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2. Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và trong mỗi lô hóa chất HAV IgM khác nhau có thể có sự thay đổi về giới hạn chứng

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có)

3. Kết quả và báo cáo

Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên số đo của Cal1 và Cal2. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

- Nếu $COI \geq 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với HAV IgM.
- Nếu $COI < 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với HAV IgM.

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).
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

110. HAV total miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HAV toàn phần trong máu kháng HAV(virus viêm gan A)

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C).
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Micropipet 100 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Định mức sinh phẩm và vật tư tiêu hao cho 3 mẫu/lần thực hiện (VD)

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,600
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,033
7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,033

8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	2,000
10	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,000
11	Đầu cân 200 µl	Cái	3,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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)
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu (xem phụ lục 6).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm ETI – AB – HAVK PLUS DiaSorin (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HAV Ab
1	Chuẩn bị sinh phẩm, sơ đồ nhỏ mẫu. Chuẩn bị dung dịch rửa.
2	Nhỏ dung dịch pha loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng phản ứng theo hướng dẫn. Nhỏ chứng, bệnh phẩm, dung dịch chuẩn, dung dịch liên kết theo thứ tự hướng dẫn của nhà sản xuất.

3	Ủ tấm phản ứng ở nhiệt độ và trong thời gian quy định theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
4	Chuẩn bị dung dịch cộng hợp theo hướng dẫn.
5	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng theo hướng dẫn
6	Rửa khay phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
7	Nhỏ dung dịch cộng hợp vào các giếng theo hướng dẫn
8	Ủ ở nhiệt độ và trong thời gian quy định theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
9	Rửa tấm phản ứng bằng chương trình theo quy trình hướng dẫn.
10	Pha dung dịch cơ chất và nhỏ vào mỗi giếng. Đề ở nhiệt độ phòng (15 ⁰ C -30 ⁰ C) tránh ánh sáng theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
11	Dừng phản ứng.
12	Đọc kết quả ở bước sóng 450/630 nm bằng máy đo mật độ quang.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện

- Giếng trắng (Blank): $0.000 \leq \text{BLK} \leq 0.150$
- Giá trị trung bình của Cal: $\text{PC} < \text{Cal } \bar{x} < 0.6 \text{ NC}$
- Giá trị của Cal: $\text{PC} < \text{Cal} < 0.6 \text{ NC}$
- Giá trị chứng âm (NC): $0.5 < \text{NC} < 2.5$
- Giá trị chứng dương (PC): $0.000 \leq \text{PC} \leq 0.250$
 $\text{NC} - \text{PC} > 0.250$

2. Kết quả và báo cáo

- **Tính giá trị ngưỡng Cut-off value (CO)**

$$\text{CO} = \text{Cal } \bar{x}$$

- **Giá trị của thử nghiệm:**

Tính tỉ số mẫu:

$$\text{Tỉ số mẫu} = \text{OD mẫu} / \text{CO}$$

Giải thích kết quả

- Các mẫu có tỉ số mẫu nhỏ hơn 0,8 được coi là dương tính với HAV Ab
- Các mẫu có tỉ số mẫu > 1.2 được coi là âm tính với HAV Ab.
- Các mẫu nằm trong khoảng từ 0.8 đến 1.2 so với giá trị của CO phải được kiểm tra lại.

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.
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...) ,
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

111. HAV total miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể HAV toàn phần kháng virus viêm gan A (HAV total) trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể HAV toàn phần dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C) (nếu có)
- Micropipette thể tích 50 µl - 200 µl

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

Thực hiện xét nghiệm 05 mẫu/lần.

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000

10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,400
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,005
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,005
14	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
15	Cleancell M	ml	3,000
16	Procell M	ml	3,000
17	Probe Wash M	ml	2,000
18	Preclean M	ml	2,000
19	Assay Tip/Cup E170	chiếc	3,000
20	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
21	Nước cất	ml	5,000
22	Control	Test	0,100
23	Sample cup	Chiếc	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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.

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 chi tiết phụ lục 2

- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys Anti-HAV 2 - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Anti-HAV Total
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là anti-HBc
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2. Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định. Giới hạn này được qui định trong bộ chứng và trong mỗi lô hóa chất Anti-HAV khác nhau có thể có sự thay đổi về giới hạn chứng.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có).

3. Kết quả và báo cáo

Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên số đo của Cal1 và Cal2. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

- Nếu $COI \leq 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với Anti-HAV Total.
- Nếu $COI > 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với Anti-HAV Total.

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).
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

112. HDV Ag miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên của virus viêm gan D (HDV Ag) trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 µl đến 1000 µl .
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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	Test	2,000

	tra chất lượng		
11	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
12	Nước cất	ml	8,000
13	Đầu cân 1000 µl	Cái	2,000
14	Đầu cân 200 µl	Cái	5,000
15	Giấy thấm	Cuộn	0,100
16	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
17	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
18	Bút viết kính	Cái	0,020
19	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 nước 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

* 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.

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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm ETI-DELTAK-2 - Diasorin (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HDV Ag
2.1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.5	Nhỏ dung dịch Nonidet P-40

2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh
2.7	Đậy nắp và ủ ở 37°C trong 45 phút
2.8	Chuẩn bị cộng hợp
2.9	Rửa phiến nhựa
2.10	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.11	Đậy nắp và ủ
2.12	Rửa phiến nhựa
2.13	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.14	Ủ, không đậy nắp và tránh ánh sáng
2.15	Dừng phản ứng
2.16	Đọc kết quả ở bước sóng 450/630nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính giá trị ngưỡng

Cut-off (CO) = Giá trị trung bình chứng âm + 0.100

1. Điều kiện của phản ứng

- OD của giếng trống ≤ 0.150 .
- OD của trung bình chứng âm < 0.100
- OD của mỗi chứng âm < 0.110
- Trung bình chứng dương – trung bình chứng âm ≥ 0.5

3. Diễn giải kết quả

- + Dương tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $\geq$ OD của cut-off
- + Nghi ngờ: nếu tỉ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 10 % OD của cut-off
- + Âm tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $<$ OD của cut-off
- Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm lần 2.
 - + Nếu kết quả OD lần 2 $>$ CO $\rightarrow$ kết luận dương tính
 - + Nếu kết quả OD lần 2 $<$ CO $\rightarrow$ kết luận âm 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 oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy 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.

113. HDV IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus viêm gan D trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus viêm gan D dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 µl đến 1000 µl .
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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	2,000
11	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
12	Nước cất	ml	8,000
13	Đầu côn 1000 µl	Cái	2,000
14	Đầu côn 200 µl	Cái	5,000
15	Giấy thấm	Cuộn	0,100
16	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
17	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
18	Bút viết kính	Cái	0,020
19	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 nước 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

* 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.

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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm ETI - DELTA - IgMK-2 - Diasorin (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HDV IgM
2.1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng bệnh phẩm
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.

2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh
2.7	Đậy tấm và ủ
2.8	Rửa
2.9	Nhỏ dung dịch kháng nguyên
2.10	Đậy tấm và ủ
2.11	Chuẩn bị cộng hợp
2.12	Rửa
2.13	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.14	Đậy tấm và ủ
2.15	Rửa
2.16	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.17	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.18	Dừng phản ứng
2.19	Đọc kết quả ở bước sóng 450/630nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính giá trị ngưỡng

Cut-off (CO) = Giá trị trung bình chứng âm + 0.100

2. Điều kiện của phản ứng

- OD của giếng trống ≤ 0.150 .
- OD của trung bình chứng âm < 0.100
- Trung bình chứng dương – trung bình chứng âm ≥ 0.300

3. Diễn giải kết quả

- + Dương tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $\geq$ OD của cut-off
- + Nghi ngờ: nếu tỉ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 10 % OD của cut-off
- + Âm tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $<$ OD của cut-off
- Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm lần 2.
 - + Nếu kết quả dương tính lặp lại $\rightarrow$ kết luận dương tính
 - + Nếu kết quả lần 2 âm tính $\rightarrow$ kết luận âm tính

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 quy 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

114. HDV Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể kháng virus viêm gan D (HDV Ab) trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể kháng virus viêm gan D dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C.
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C) (nếu có).
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 µl đến 1000 µl .
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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	Test	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	Test	2,000

	tra chất lượng		
11	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
12	Nước cất	ml	8,000
13	Đầu cân 1000 µl	Cái	2,000
14	Đầu cân 200 µl	Cái	5,000
15	Giấy thấm	Cuộn	0,100
16	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
17	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
18	Bút viết kính	Cái	0,020
19	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 nước 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

* 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.

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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm ETI - AB - DELTAK-2 - Diasorin (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HDV Ab
2.1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Chuẩn bị cộng hợp
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh
2.7	Nhỏ chất cộng hợp
2.8	Đậy nắp và ủ

2.9	Rửa
2.10	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.11	Ủ, không đậy nắp và tránh ánh sáng
2.12	Dừng phản ứng
2.13	Đọc kết quả ở bước sóng 450/630nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính giá trị ngưỡng (cut-off CO)

CO = Giá trị TB chứng âm x 0.5 + Giá trị TB chứng dương x 0.5

2. Điều kiện của phản ứng

- OD của giếng trống ≤ 0.150 .
- OD của trung bình chứng âm ≥ 0.600
- OD của trung bình chứng dương ≤ 0.800
- Trung bình chứng âm – trung bình chứng dương ≥ 0.500

3. Diễn giải kết quả

- + Dương tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $\leq$ OD của cut-off
- + Nghi ngờ: nếu tỉ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 10 % OD của cut-off
- + Âm tính: nếu OD của mẫu bệnh phẩm $\geq$ OD của cut-off
- Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm lần 2.
- + Nếu kết quả dương tính lặp lại $\rightarrow$ kết luận dương tính
- + Nếu kết quả lần 2 âm tính $\rightarrow$ kết luận âm tính

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 bẩn 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 quy 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.

115. HEV IgM test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus viêm gan E (HEV) trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus viêm gan E dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Micropipette 50 µl -100 µl.
- Máy ly tâm thường.
- Đồng hồ bấm giây.

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,200
6	Ngoại kiểm chứng (nếu có)*		0,02
7	Đầu côn 200 µl	Cái	1,200
8	Giấy thấm	Cuộn	0,100
9	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
10	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
11	Bút viết kính	Cái	0,020
12	Bút bi	Cái	0,010
13	Mũ	Cái	0,020

14	Khẩu trang	Cái	0,020
15	Găng tay	Đôi	0,100
16	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
17	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
18	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
19	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
20	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
21	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm HEV IgM Rapid test (VD).

Các bước	Xét nghiệm phát hiện HEV IgM nhanh
1	Lấy số lượng thanh thử cần thiết. Ghi mã bệnh phẩm tương ứng
2	Nhỏ huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm theo hướng dẫn.
3	Nhỏ dung dịch đệm phản ứng vào giếng (2) theo hướng dẫn.
4	Nhỏ dung dịch đệm vào giếng (3) theo hướng dẫn.
5	Chờ 15 phút đọc kết quả.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dương tính: Xuất hiện 2 vạch đỏ ở phần chứng và phần bệnh phẩm.
- Âm tính: Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần chứng.
- Không xác định:
 - + Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần bệnh phẩm.
 - + Không có vạch đỏ nào xuất hiện ở phần chứng và phần bệnh phẩm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Thời gian đọc KQ → ghi lại thời gian làm xét nghiệm và thời gian đọc kết quả để tránh dương tính giả và âm tính giả.
- Chất lượng bệnh phẩm: những mẫu bệnh phẩm tan huyết sẽ ảnh hưởng đến chất lượng và kết quả xét nghiệm.

116. HEV IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus viêm gan E trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus viêm gan E dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 µl đến 1000 µl .
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 04 mẫu/lần.

STT	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	Test	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	Test	1,200

	tra chất lượng		
11	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
12	Nước cất	ml	8,000
13	Đầu côn 1000 µl	Cái	2,000
14	Đầu côn 200 µl	Cái	5,000
15	Giấy thấm	Cuộn	0,100
16	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
17	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
18	Bút viết kính	Cái	0,020
19	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 nước 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

* 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.

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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm HEV IgM ELISA - DRG (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HEV IgM
2.1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng bệnh phẩm
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ dung dịch trung hòa vào những giếng nhỏ bệnh phẩm
2.7	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.8	Đậy nắp và ủ

2.9	Rửa
2.10	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.11	Đậy tấm và ủ
2.12	Rửa
2.13	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.14	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.15	Dừng phản ứng
2.16	Đọc kết quả ở bước sóng 450/630nm trong vòng 60 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- OD của giếng trống $\leq 0,100$
- OD của chứng âm $< 0,100$
- OD của chứng dương $> 0,500$

2. Tính giá trị ngưỡng

- Cut-off (CO) = Giá trị trung bình chứng âm + 0.25

3. Diễn giải kết quả

Tính tỷ số Bệnh phẩm/CO (R)

- + Dương tính: $R > 1,2$
- + Nghi ngờ: $1 < R \leq 1,2 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm lần 2 sau 1 – 2 tuần
- + Âm tính: $R < 1$

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 quy 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

117. HIV Ab test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể kháng HIV dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh đồng thời được đào tạo và có chứng chỉ về xét nghiệm HIV theo quy định của Bộ Y tế.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh đồng thời được đào tạo và có chứng chỉ về xét nghiệm HIV theo quy định của Bộ Y tế.

2. Phương tiện, hóa chất

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

2.1. Trang thiết bị

- Máy ly tâm thường.
- Micropipette 50 µl -100 µl.
- Đồng hồ bấm giây

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng	Test	0,200
11	EQAS (nếu thực hiện) *		0,02
12	Đầu côn 200 µl	Cái	2,000
13	Giấy thấm	Cuộn	0,100

14	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
15	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
16	Bút viết kính	Cái	0,020
17	Bút bi	Cái	0,010
18	Mũ	Cái	0,020
19	Khẩu trang	Cái	0,020
20	Găng tay	Đôi	0,100
21	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
22	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
23	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
24	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
25	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
26	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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, huyết tương của người 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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Determine HIV ½ Ab.(VD).

Các bước	Xét nghiệm phát hiện kháng thể HIV nhanh
1	Tách rời từng thanh xét nghiệm rồi bóc vỏ Ghi mã bệnh phẩm xét nghiệm tương ứng
2	Nhỏ 50 µl huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần vào vùng nhỏ bệnh phẩm
3	Chờ 15 phút đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ (Kết quả sơ bộ)

- Dương tính: Xuất hiện 2 vạch đỏ ở phần chứng và phần bệnh phẩm.
- Âm tính: Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần chứng.
- Không xác định:

+ Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần bệnh phẩm.

+ Không có vạch đỏ nào xuất hiện ở phần chứng và phần bệnh phẩm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Thời gian đọc KQ → ghi lại thời gian làm xét nghiệm và thời gian đọc kết quả để tránh dương tính giả và âm tính giả.

- Chất lượng bệnh phẩm: những mẫu bệnh phẩm tan huyết sẽ ảnh hưởng đến chất lượng và kết quả xét nghiệm.

118. HIV Ag/Ab test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên p24 và kháng thể kháng HIV-1 và HIV-2 trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng nguyên p24 và kháng thể kháng HIV-1 và HIV-2 dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh đồng thời được đào tạo và có chứng chỉ về xét nghiệm HIV theo qui định của Bộ Y tế.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh đồng thời được đào tạo và có chứng chỉ về xét nghiệm HIV theo qui định của Bộ Y tế.

2. Phương tiện, hóa chất

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

2.1. Trang thiết bị

- Micropipette 50 µl - 100 µl.
- Máy ly tâm thường.
- Đồng hồ bấm giây.

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	0,200

11	EQAS (nếu thực hiện) *		0,02
12	Đầu côn 200 µl	Cái	2,000
13	Giấy thấm	Cuộn	0,100
14	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
15	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
16	Bút viết kính	Cái	0,020
17	Bút bi	Cái	0,010
18	Mũ	Cái	0,020
19	Khẩu trang	Cái	0,020
20	Găng tay	Đôi	0,100
21	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
22	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
23	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
24	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
25	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
26	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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, huyết tương hoặc máu toàn phần của người 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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Alere Determine HIV 1/2 Ag/Ab Combo - Alere (VD)

Các bước	Xét nghiệm phát hiện kháng nguyên-kháng thể HIV
Đối với huyết thanh/huyết tương	
1	Tách rời từng thanh xét nghiệm rồi xé bao bảo vệ thanh xét nghiệm. Ghi mã bệnh phẩm xét nghiệm tương ứng
2	Nhỏ 50 µl huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm
3	Chờ 20 phút đọc kết quả
Đối với máu toàn phần	
1	Tách rời từng thanh xét nghiệm rồi bóc vỏ

	Ghi mã bệnh phẩm xét nghiệm tương ứng
2	Nhỏ 50 μ l huyết thanh hoặc huyết tương vào vùng nhỏ bệnh phẩm
3	Đợi một phút, sau đó cho một giọt dung dịch đệm Chase vào vùng nhỏ mẫu bệnh phẩm
4	Chờ 20 phút đọc kết quả
<i>Lưu ý (đối với cả huyết thanh, huyết tương và máu toàn phần):</i> Không đọc kết quả sau quá 30 phút	

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng:

- Vạch chứng phải chuyển màu đỏ khi xét nghiệm hoàn tất.
- Nếu vạch chứng không xuất hiện thì kết quả xét nghiệm không có giá trị và mẫu phẩm cần phải được thử lại.

2. Nhận định kết quả

- Có phản ứng với kháng thể: Xuất hiện 2 vạch đỏ ở vùng chứng và vùng kháng thể.
- Có phản ứng với kháng nguyên (p24): Xuất hiện 2 vạch đỏ ở vùng chứng và vùng kháng nguyên.
- Có phản ứng với kháng thể và kháng nguyên (p24): Xuất hiện 3 vạch đỏ ở vùng chứng, vùng kháng thể và vùng kháng nguyên.
- Âm tính: Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần chứng.
- Không xác định:
 - + Chỉ có 1 vạch đỏ ở phần bệnh phẩm.
 - + Không có vạch đỏ nào xuất hiện ở phần chứng và phần bệnh phẩm → cần phải thử lại mẫu phẩm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Đọc kết quả sau quá 30 phút dễ gây phản ứng dương tính giả → Nên có đồng hồ đặt giờ để đọc kết quả đúng giờ qui định.

119. HIV Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể kháng HIV trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể kháng HIV dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh đồng thời được đào tạo và có chứng chỉ về xét nghiệm HIV theo qui định của Bộ Y tế.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh đồng thời được đào tạo và có chứng chỉ về xét nghiệm HIV theo qui định của Bộ Y tế.

2. Phương tiện, hóa chất

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

2.1. Trang thiết bị

- Bàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm sâu (-20°C hoặc -70°C) (nếu có).
- Tủ lạnh $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette 100 μl , 1000 μl .
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Thực hiện xét nghiệm 10 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Tube lưu mẫu dương tính	Cái	0,200
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra	Test	0,300

	chất lượng		
7	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,030
8	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,030
9	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
10	Nước cất	ml	8,000
11	Đầu côn 1000 µl	Cái	2,000
12	Đầu côn 200 µl	Cái	2,000
13	Giấy thấm	Cuộn	0,100
14	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
15	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
16	Bút viết kính	Cái	0,020
17	Bút bi	Cái	0,010
18	Mũ	Cái	0,020
19	Khẩu trang	Cái	0,020
20	Găng tay	Đôi	0,100
21	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
22	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
23	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
24	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
25	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
26	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 của người 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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm GENSCREEN™ HIV 1/2 version 2 Bio-Rad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HIV Ab
1	Lấy sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm. Lập sơ đồ phân phối mẫu

2	Chuẩn bị chất cộng hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất
3	Lấy phiến nhựa và các thanh giếng. Nhỏ dung dịch pha loãng bệnh phẩm vào mỗi giếng phản ứng theo hướng dẫn.
4	Nhỏ chứng âm (R3); Cut-off (R4); Chứng dương (R5), mẫu EQC (nếu có), mẫu bệnh phẩm vào các giếng tiếp theo như hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Đậy và ủ ở nhiệt độ và trong thời gian theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
6	Rửa phiến phản ứng bằng máy rửa theo chương trình hướng dẫn
7	Nhỏ cộng hợp theo hướng dẫn.
8	Đậy phiến phản ứng và ủ nhiệt độ và trong thời gian theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.
9	Rửa phiến phản ứng bằng máy rửa theo chương trình hướng dẫn của nhà sản xuất
10	Nhỏ hiện màu cơ chất theo hướng dẫn
11	Đề tối nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) và tránh ánh sáng theo hướng dẫn.
12	Dùng phản ứng. Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Kiểm tra và báo cáo kết quả

Tính giá trị trung bình của cut-off: $\overline{\text{ODR4}}$

Tính giá trị cut-off: $\text{C.O} = \overline{\text{ODR4}} : 10$

- Điều kiện thỏa mãn:

+ OD của Chứng âm < 0.7 x C.O

+ $\overline{\text{ODR4}} > 0.8$

+ $\overline{\text{ODR5}} / \overline{\text{ODR4}} \geq 1.3$

Sự có mặt hay không có mặt KT HIV1 và/hoặc HIV2 được xác định bằng cách đo so sánh mật độ quang của mỗi mẫu thử với giá trị ngưỡng.

Biện luận kết quả

- **Kết quả âm tính:** Mẫu thử có OD < C.O được coi như âm tính với GENSCREEN™ HIV ½ version 2

- **Kết quả dương tính:** Mẫu thử có OD ≥ C.O được coi như dương tính với GENSCREEN™ HIV ½ version 2

Những mẫu dương tính cần phải được kiểm tra lại bằng hai bộ sinh phẩm khác có nguyên lý chuẩn bị kháng nguyên khác nhau để khẳng định mẫu đó là dương tính với HIV theo qui định.

- Mẫu có OD nằm trong khoảng $\text{C.O} - 10\% < \text{OD} < \text{C.O}$ cần thận trọng và nên được kiểm tra lại.

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 có nồng độ kháng thể cao.
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

120. HIV Ag/Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên, kháng thể HIV Ag/Ab trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng nguyên, kháng thể HIV Ag/Ab dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh đồng thời được đào tạo và có chứng chỉ về xét nghiệm HIV theo qui định của Bộ Y tế.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh đồng thời được đào tạo và có chứng chỉ về xét nghiệm HIV theo qui định của Bộ Y tế.

2. Phương tiện, hóa chất

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

2.1. Trang thiết bị

- Bàn máy ELISA.
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C) (nếu có).
- Micropipette 100 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có).
- Ống đong có vạch dung tích 25ml, 100ml, 1000ml

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

Thực hiện xét nghiệm 10 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Tube lưu mẫu dương tính	Cái	0,200
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra	Test	0,300

	chất lượng		
7	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,030
8	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,030
9	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
10	Nước cất	ml	8,000
11	Đầu côn 1000 µl	Cái	2,000
12	Đầu côn 200 µl	Cái	2,000
13	Giấy thấm	Cuộn	0,100
14	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
15	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
16	Bút viết kính	Cái	0,020
17	Bút bi	Cái	0,010
18	Mũ	Cái	0,020
19	Khẩu trang	Cái	0,020
20	Găng tay	Đôi	0,100
21	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
22	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
23	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
24	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
25	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
26	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 của người 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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm GENSCREEN™ ULTRA HIV Ag-Ab. Bio-Rad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HIV Ag/Ab
1	Lấy sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm. Lập sơ đồ phân phối mẫu

2	Chuẩn bị dung dịch rửa pha loãng, chuẩn bị chất cộng hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất
3	Lấy phiến nhựa và các thanh giếng. Nhỏ chất cộng hợp 1 vào mỗi giếng phản ứng.
4	Nhỏ chứng dương HIV Ag (R5); Chứng dương HIV Ab (R4); Chứng âm (R3), mẫu EQC (nếu có), mẫu bệnh phẩm vào các giếng tiếp theo như hướng dẫn của nhà sản xuất.
5	Đậy và ủ phiến phản ứng ở nhiệt độ thích hợp trong thời gian quy định theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
6	Rửa phiến phản ứng bằng máy rửa theo chương trình hướng dẫn
7	Nhỏ cộng hợp 2
8	Đậy phiến phản ứng và ủ ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C - 30 ⁰ C) trong thời gian quy định theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
9	Rửa phiến phản ứng bằng máy rửa theo chương trình hướng dẫn
10	Nhỏ hiện màu
11	Để ở nhiệt độ phòng (18 ⁰ C – 30 ⁰ C) và tránh ánh sáng theo hướng dẫn.
12	Dừng phản ứng. Đọc KQ ở bước sóng 450/620 -700 nm

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Kiểm tra chất lượng

- Độ hấp phụ của mỗi chứng âm phải nhỏ hơn 0,170: OD R3 < 0,170 .

Nếu một chứng âm OD > 0.17 thì bỏ đi và tính trung bình hai kết quả còn lại. Đến đây chỉ một trong hai trị số bị bỏ đi mà thôi .

- Độ hấp phụ trung bình của các chứng âm ($\overline{R3}$) phải nhỏ hơn 0,150: OD R3 < 0,150.

- Độ hấp phụ của chứng dương HIV Ab (R4) phải lớn hơn 0,9: OD R4 > 0,9

- Độ hấp phụ của chứng dương HIV Ag (R5) phải lớn hơn 0,9: OD R5 > 0,9

2. Kết quả và báo cáo

- **Tính độ hấp thụ trung bình của chứng âm (OD R3)**

$$\overline{OD\ R3} = \frac{OD\ (C1) + OD\ (D1) + OD\ (E1)}{3}$$

- **Tính giá trị ngưỡng (C.O)**

Giá trị ngưỡng được tính theo công thức :

$$C.O = \overline{OD\ R3} + 0,200$$

Biện luận kết quả

- **Kết quả âm tính:** Mẫu thử có OD < C.O được coi như âm tính với GENSCREEN™ ULTRA HIV Ag-Ab

- **Kết quả dương tính:** Mẫu thử có OD $\geq$ C.O được coi như dương tính với GENSCREENTM ULTRA HIV Ag-Ab

Những mẫu dương tính cần phải được kiểm tra lại bằng hai bộ sinh phẩm khác có nguyên lý chuẩn bị kháng nguyên khác nhau để khẳng định mẫu đó là dương tính với HIV theo qui định.

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.
- Cơ chất bị nhiễm bởi các tác nhân oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

121. HIV Ag/Ab miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên, kháng thể HIV Ag/Ab trong huyết thanh, huyết tương.

2. Nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh đồng thời được đào tạo và có chứng chỉ về xét nghiệm HIV theo quy định của Bộ Y tế.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh đồng thời được đào tạo và có chứng chỉ về xét nghiệm HIV theo quy định của Bộ Y tế.

2. Phương tiện, hóa chất

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

2.1. Trang thiết bị

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 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)

Thực hiện xét nghiệm 80 mẫu/lần.

STT	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	1,000

9	Tube lưu mẫu dương tính	Cái	0,200
10	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,010
12	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,050
13	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,010
14	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,010
15	Chứng nội kiểm	ml	0,500
16	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
17	Cleancell M	ml	3,000
18	Procell M	ml	3,000
19	Probe Wash M	ml	2,000
20	Preclean M	ml	2,000
21	Assay Tip/Cup E170	Chiếc	3,000
22	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
23	Nước cất	ml	5,000
24	Sample cup	Cái	1,000
25	Giấy thấm	Cuộn	0,100
26	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
27	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
28	Bút viết kính	Cái	0,020
29	Bút bi	Cái	0,010
30	Mũ	Cái	0,020
31	Khẩu trang	Cái	0,020
32	Găng tay	Đôi	0,100
33	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
34	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
35	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
36	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
37	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
38	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys HIV Combi - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HIV
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn.
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút mẫu và chứng vào sample cup tương ứng
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm và ngày thực hiện xét nghiệm
4	Chọn tên test là HIV
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh Sample Cup lên Rack đúng vị trí đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định định vào hệ thống LIS
2	Đưa ống máu dán barcode vào rack vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm.

3. Kết quả và báo cáo

- Mẫu huyết thanh: Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên số đo của Cal1 và Cal2. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là dương tính hoặc âm tính cùng với chỉ số ngưỡng (COI).

Kết quả được diễn giải như sau:

- Nếu $COI < 0.90$: mẫu bệnh phẩm được coi là âm tính với HIV.
- Nếu $0.90 \leq COI \leq 1.0$: mẫu bệnh phẩm này nằm ở giới hạn ngưỡng và cần kiểm tra lại.
- Nếu $COI > 1.0$: mẫu bệnh phẩm được coi là dương tính với thử nghiệm HIV combi.

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).
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

122. HIV khẳng định

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Khẳng định chẩn đoán nhiễm HIV ở người trên 18 tháng tuổi.

2. Nguyên lý

Sử dụng chiến lược III áp dụng cho các trường hợp nhiễm HIV ở những người trên 18 tháng tuổi bằng ba loại sinh phẩm với nguyên lý hoặc chuẩn bị kháng nguyên khác nhau.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Đáp ứng Khoản 1 Điều 5 thông tư 15/2013/TT-BYT
- Có kinh nghiệm làm xét nghiệm HIV ít nhất 01 năm.
- Có hiểu biết cơ bản về HIV và kỹ thuật xét nghiệm HIV đồng thời có khả năng phân tích và biện giải kết quả xét nghiệm
- Có hiểu biết về các văn bản quy phạm pháp luật liên quan đến xét nghiệm HIV.
- Người phụ trách và nhân viên của phòng xét nghiệm khẳng định HIV phải đáp ứng điều kiện quy định tại khoản 3 Điều 5 Nghị định số 92/2010/NĐ-CP
- Người thực hiện Cán bộ xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng nhận đã qua đào tạo về xét nghiệm HIV.
- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học đã được đào tạo và có chứng nhận đã qua đào tạo về xét nghiệm HIV.

2. Phương tiện, hóa chất

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

2.1. Trang thiết bị

Đáp ứng các điều kiện quy định tại Điều 8 thông tư 15/2013/TT-BYT

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

Thực hiện xét nghiệm 10 mẫu/lần.

STT	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	Tube lưu mẫu dương tính	Cái	0,200
10	Sinh phẩm chẩn đoán 1	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng 1	Test	0,430
12	Sinh phẩm chẩn đoán 2	Test	1,000
13	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng 2	Test	0,430
14	Sinh phẩm chẩn đoán 3	Test	1,000
15	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng 3	Test	0,330
16	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,030
17	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,030
18	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
19	Nước cất	ml	8,000
20	Đầu cân 1000 µl	Cái	2,000
21	Đầu cân 200 µl	Cái	2,000
22	Giấy thấm	Cuộn	0,100
23	Giấy xét nghiệm	Tờ	3,000
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
25	Bút viết kính	Cái	0,020
26	Bút bi	Cái	0,010
27	Mũ	Cái	0,020
28	Khẩu trang	Cái	0,020
29	Găng tay	Đôi	0,100
30	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
31	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
32	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
33	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
34	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
35	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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.

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 chi tiết phụ lục 2
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bước	Mô tả
1.	Xét nghiệm
1.1.	Xét nghiệm sử dụng sinh phẩm 1 có độ nhạy cao phát hiện được cả kháng nguyên và kháng thể HIV để sàng lọc (XN SP1) Nếu xét nghiệm SP1 âm tính tiếp tục thực hiện bước 2.1 Nếu xét nghiệm SP1 dương tính, thực hiện bước 1.2
1.2	Xét nghiệm sử dụng sinh phẩm thứ 2 có độ đặc hiệu cao (XN SP2) Nếu xét nghiệm SP2 âm tính, thực hiện bước 1.3 Nếu xét nghiệm SP2 dương tính, thực hiện bước 1.4
1.3	Xét nghiệm lại với sinh phẩm 1 (SP1) và sinh phẩm 2 (SP2) Nếu cả 2 xét nghiệm âm tính, thực hiện bước 2.1 Nếu cả 2 xét nghiệm dương tính, thực hiện bước 1.4 Nếu xét nghiệm SP1 dương tính, SP2 âm tính thực hiện bước 1.4
1.4	Xét nghiệm sử dụng sinh phẩm thứ 3 có độ đặc hiệu cao (XN SP3) Nếu xét nghiệm SP3 âm tính, SP1 và SP2 dương tính thực hiện bước 2.2 Nếu xét nghiệm SP3 âm tính, SP1 dương tính và SP2 âm tính thực hiện bước 2.2 Nếu xét nghiệm SP3 dương tính, SP1 dương tính và SP2 âm tính thực hiện bước 2.2 Nếu cả 3 xét nghiệm SP1, SP2 và SP3 dương tính thực hiện bước 2.3
2.	Biện luận trả kết quả
2.1.	Trả kết quả: âm tính
2.2.	Trả kết quả: không xác định và hẹn xét nghiệm lại sau 2 tuần.
2.3.	Trả kết quả: dương tính.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm (nếu có).

3. Kết quả và báo cáo

- Âm tính: Không có kháng thể kháng HIV trong mẫu xét nghiệm.
- Dương tính: Khẳng định tình trạng nhiễm HIV.

- Không xác định: Trường hợp nghi ngờ không kết luận âm tính hoặc dương tính. Cần xét nghiệm lại sau 2 tuần. Sau 2 tuần nếu :

+ Kết quả âm tính kết luận là âm tính.

+ Kết quả dương tính theo chiến lược 3, kết luận là dương tính.

+ Kết quả lần 2 không có sự thay đổi về mức độ phản ứng giữa hai lần xét nghiệm, người bệnh không thuộc đối tượng có hành vi nguy cơ cao thì kết luận là âm tính.

+ Kết quả lần 2 có sự thay đổi hoặc nghi ngờ chuyển đổi huyết thanh, xét nghiệm lại lần 3 sau 2 tuần. Nếu kết quả lần 3 vẫn không xác định thì kết luận là âm tính.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Thực hiện đúng theo Hướng dẫn Quốc gia về xét nghiệm huyết thanh học HIV (Ban hành kèm theo Quyết định số 1098/QĐ-BYT ngày 04 tháng 4 năm 2013).

123. HIV đo tải lượng Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định số lượng HIV trong một đơn vị thể tích (1ml) huyết tương.

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2.
- Máy Real-time PCR và hệ thống máy tính.
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette
- Bộ lưu điện

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000

8	Găng không có bột	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chủng và QC kiểm tra chất lượng, standard các loại	Test	1,350
11	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
12	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
13	Primer 1	ml	0,0001
14	Primer 2	ml	0,0001
15	Probe	ml	0,0001
16	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
17	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
18	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
19	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
20	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
21	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
22	Ethanol BDH	ml	0,500
23	Water-DEPC Treated	ml	2,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	cái	0,010

* 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 tương, huyết thanh

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 chi tiết phụ lục 3
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện Real-time RT-PCR

2.3. Phân tích và đánh giá kết quả

2.4. In và trả kết quả

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 dưới đường cơ bản. Các mẫu chứng dương chuẩn phải có đường đồ thị huỳnh quang xuất hiện tương ứng với nồng độ biết trước. Tải lượng virus (copies/ml) sẽ được tính toán dựa trên đường đồ thị của các mẫu chuẩn.

- Dương tính: kết quả trả số copies/ml
- Dưới ngưỡng phát hiện
- Ngưỡng phát hiện theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Trong trường hợp chứng Dương và chứng Âm xuất hiện không đúng với diễn giải ở phần IV thì phải kiểm tra lại Master mix và chứng Dương và quá trình tách RNA tổng số và làm lại 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

124. HIV đo tải lượng hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Đếm số lượng HIV trong một đơn vị thể tích (ml) huyết tương.

2. Nguyên lý

Đếm số lượng HIV trong một đơn vị thể tích (ml) huyết tương dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy tách chiết tự động (RNA, DNA) và định lượng COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan 48 Analyzer (Roche) (VD)
- Bộ lưu điện.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm thường.
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette 1000 µl

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

Thực hiện xét nghiệm 10 mẫu/lần.

STT	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	3,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,300
11	SPU	Cái	1,300
12	Tube-S	Cái	1,300
13	Tube-K	Cái	1,300
14	Tip-K	Cái	1,300
15	Kit CAP-G/CTM Wash Reagent 5.1 L	test	1,300
16	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
17	Đầu côn 1000 µl	Cái	1,000
18	Đầu côn có lọc 1000 µl (DNAase- RNAase free)	Cái	1,300
19	Giấy thấm	Cuộn	0,100
20	Giấy xét nghiệm	Tờ	3,000
21	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
22	Bút viết kính	Cái	0,020
23	Bút bi	Cái	0,010
24	Mũ	Cái	0,020
25	Khẩu trang	Cái	0,020
26	Găng không có bột tal (DNAase/RNAase free)	Đôi	0,100
27	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
28	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
29	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
30	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
31	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
32	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 từ máu có chất chống đông EDTA.

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan HIV Test (Roche Diagnostics GmbH) (VD)

2.1. Tách chiết RNA vận hành máy COBAS AmpliPrep

2.2. Phiên mã ngược RNA thành cDNA, khuếch đại cDNA, đọc kết kết trên máy COBAS TaqMan 48

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Kiểm tra chất lượng

Giá trị định lượng chấp nhận được nếu :

- Chứng âm là không phát hiện.
- Chứng nội cho giá trị Ct mong đợi.

Không nhận các kết quả của chứng không có giá trị khi xuất hiện thông báo lỗi :

- Chứng âm: Invalid
- Chứng dương thấp: Invalid, $<4.00E+01$ cp/ml, $>1.00E+07$ cp/ml, không phát hiện (Target Not Detected)
- Chứng dương cao: Invalid, $<4.00E+01$ cp/ml, $>1.00E+07$ cp/ml, không phát hiện (Target Not Detected)

2. Kết quả và báo cáo

Kết quả định lượng HIV RNA của máy COBAS TaqMan 48 được tính trực tiếp ra số copies/ml quy đổi tương ứng theo đơn vị quốc tế IU/ml là 0.6 cp/IU (1.7 IU/cp) cho HIV-1 RNA theo hệ thống quy chuẩn của WHO (tổ chức y tế thế giới).

Giá trị tham số Ct (được định nghĩa là số chu kỳ ngưỡng tại đó tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng cố định, để so sánh với chu kỳ ngưỡng của mẫu chứng chuẩn từ đó suy ra số lượng RNA mẫu đưa vào phản ứng) cho HIV-1 RNA và HIV-1QS RNA.

Các giá trị chứng của HIV-1 có nồng độ trong giới hạn được thực hiện đồng thời với mẫu bệnh phẩm để thiết lập đường chuẩn, cho thấy mối tương quan giữa giá trị Ct và số log cp/ml.

Giá trị trên máy	Trả lời kết quả
Target Not Detected	Không phát hiện thấy HIV RNA
$<4.00E+01$ cp/ml	< 40 cp/ml
$\geq 4.00E+01$ cp/ml đến $\leq 1.00E+07$ cp/ml	nhận những kết quả trong giới hạn này ≥ 40 cp/ml đến $\leq 1.00 \times 10^7$ cp/ml
$>1.00E+07$ cp/ml	$> 1.00 \times 10^7$ cp/ml
Invalid	Không giá trị, chạy lại mẫu bệnh phẩm

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Việc lấy mẫu máu, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.
- Quy trình này chỉ áp dụng cho phát hiện và định lượng HIV-RNA 1 nhóm M, O, N, không áp dụng cho HIV 2.
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

125. HIV genotype giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định genotype của virus gây suy giảm miễn dịch ở người (*Human Immunodeficiency Virus* - HIV).

2. Nguyên lý

Xác định genotype của HIV bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide trên gen đặc trưng.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng

1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột tal	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
13	Primer 2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Primer 3 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 4 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
17	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
18	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
19	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
20	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
21	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
22	Ethanol BDH	ml	0,500
23	Water-DEPC Treated	ml	2,000
24	Thạch	Gam	0,075
25	Ladder	ml	0.0025
26	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
27	Ethidium Bromide	ml	0.100
28	TAE Buffer	ml	0.100
29	Giấy thấm	Cuộn	0,100
30	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
31	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
32	Bút viết kính	Cái	0,020
33	Bút bi	Cái	0,010
34	Mũ	Cái	0,020
35	Khẩu trang	Cái	0,020
36	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
37	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
38	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
39	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
40	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
41	Khăn lau tay	cái	0,010
42	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng RT-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 của HIV trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 gen đích không bị nhiễu và phải có độ tương đồng $\geq 90\%$ mới có thể kết luận được genotype của HIV

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 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.

126. HIV kháng thuốc giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện sự thay đổi trình tự nucleotide liên quan đến kháng thuốc của virus gây suy giảm miễn dịch ở người (*Human Immunodeficiency Virus - HIV*) trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Xác định sự thay đổi trình tự nucleotide liên quan đến kháng thuốc của HIV bằng kỹ thuật giải trình tự gen.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2.
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
13	Primer 2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Primer 3 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 4 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
17	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
18	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
19	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
20	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
21	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
22	Ethanol BDH	ml	0,500
23	Water-DEPC Treated	ml	2,000
24	Thạch	Gam	0,075
25	Ladder	ml	0,0025
26	Blue Juice Gel loading dye	ml	0,003
27	Ethidium Bromide	ml	0,100
28	TAE Buffer	ml	0,100
29	Giấy thấm	Cuộn	0,100
30	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
31	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
32	Bút viết kính	Cái	0,020
33	Bút bi	Cái	0,010
34	Mũ	Cái	0,020
35	Khẩu trang	Cái	0,020
36	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
37	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
38	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
39	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
40	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
41	Khăn lau tay	cái	0,010
42	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện RT-PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Giải trình tự gen

2.5. Kiểm tra và phân tích trình tự gen kháng thuốc của HIV trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 gen đích không bị nhiễu và phải cho thấy có sự thay đổi một số vị trí nucleotide trên gen tương ứng với các loại thuốc điều trị HIV

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 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.

127. Dengue virus NS1Ag test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên NS1 của virus dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng nguyên NS1 của virus dengue dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy ly tâm thường
- Pipet vi lượng 5 µl đến 100 µl.
- Đồng hồ bấm giây.

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng	Test	0,200
11	Đầu côn 200 µl	Cái	2,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000

14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Dengue NS1Ag Strip - BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Dengue NS1 Ag
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Sử dụng ống nghiệm bằng nhựa hoặc thủy tinh có chiều cao > 45 mm và đường kính nhỏ hơn 15 mm. Ghi số bệnh phẩm lên ống nghiệm.
2.3	Hút huyết thanh/huyết tương vào trong ống nghiệm.
2.4	Nhỏ thêm 1 giọt dung dịch di chuyển (migration buffer) vào ống nghiệm. Lắc nhẹ nhàng để trộn đều.
2.5	Đặt thanh thử theo phương thẳng đứng vào trong ống nghiệm, hướng chiều mũi tên xuống dưới. Kiểm tra để đảm bảo thanh thử đã được nhúng vào dung dịch bệnh phẩm đã pha loãng.
2.6	Đọc kết quả sau 15 phút

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Âm tính: Chỉ 1 một đường màu xuất hiện ở vùng chứng.

- Dương tính: 2 đường màu xuất hiện ở vùng chứng và vùng thử nghiệm
- Không có giá trị: Không thấy xuất hiện đường màu nào. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

Lưu ý: Đối với những mẫu huyết thanh/huyết tương kép và những mẫu âm tính thì để nguyên thanh thử trong ống nghiệm và đọc lại kết quả sau 15 phút nữa.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Không thấy sự di chuyển của bệnh phẩm trên màng sắc ký → Kiểm tra để đảm bảo thanh thử đã được nhúng vào dung dịch bệnh phẩm đã pha loãng.

128. Dengue virus NS1Ag/IgM/IgG test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên NS1 và kháng thể IgM/IgG kháng virus dengue trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần..

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng nguyên NS1 của virus dengue và kháng thể IgM/IgG kháng virus dengue dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy ly tâm thường
- Micropipette 5 µl đến 100 µl.
- Đồng hồ bấm giây

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

TT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng	Test	0,300
11	Đầu côn 200 µl	Cái	2,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100

13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

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.

1. Lấy bệnh phẩm

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh: xem chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm SD Bioline Dengue Duo - SD (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Dengue NS1 Ag & Dengue IgM/IgG
2.1	Đổ Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Bóc vỏ nhôm lấy thanh thử đặt lên bề mặt phẳng
	Dengue NS1 Ag
2.3	Dùng pipet nhựa to có sẵn trong hộp nhỏ 3 giọt (tương đương 100 µl) bệnh phẩm vào giếng nhỏ bệnh phẩm (S)
2.4	Đọc kết quả sau 15 phút - 20 phút
	Dengue IgM/IgG
2.5	Dùng pipet nhựa nhỏ có sẵn trong hộp hút huyết thanh/huyết tương đến vạch màu xanh (tương đương 10 µl), nhỏ bệnh phẩm vào giếng nhỏ bệnh phẩm (S)
2.6	Nhỏ 4 giọt dung dịch pha loãng vào giếng hình tròn ở phần đầu của thanh thử
2.7	Đọc kết quả sau 15 phút - 20 phút

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dengue NS1 Ag

- Âm tính: Chỉ 1 một đường màu xuất hiện ở vùng chứng.
- Dương tính: 2 đường màu xuất hiện ở vùng chứng và vùng thử nghiệm.
- Không có giá trị: Không thấy xuất hiện đường màu nào. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

2. Dengue IgM/IgG

Việc đánh giá kết quả cần dựa vào kết quả phối hợp của vạch thử nghiệm IgM, IgG và vạch chứng.

*** Nhiễm trùng tiên phát**

Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgM và vùng chứng → Thử nghiệm dương tính với kháng thể IgM và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue tiên phát.

*** Nhiễm trùng thứ phát**

- Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgM, IgG và vùng chứng → Kháng thể IgM và IgG dương tính và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue thứ phát.
- Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgG và vùng chứng → Kháng thể IgG dương tính và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue thứ phát.

*** Âm tính**

Vạch màu hồng chỉ xuất hiện ở vùng chứng → Không phát hiện được kháng thể IgM và IgG kháng dengue. Kiểm tra lại sau 3 - 4 ngày nếu nghi ngờ có nhiễm virus dengue.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Đọc kết quả sau quá 20 phút dễ gây phản ứng dương tính giả → Nên có đồng hồ đặt giờ để đọc kết quả đúng giờ qui định.

129. Dengue virus IgM/IgG test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM/IgG kháng virus dengue trong huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM/IgG kháng virus dengue dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy ly tâm thường
- Micropipette 5 µl đến 100 µl.
- Đồng hồ bấm giây

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra chất lượng	Test	0,300
11	Đầu côn 200 µl	Cái	2,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000

14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

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.

1. Lấy bệnh phẩm

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh: xem chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm SD Bioline Dengue Rapid Test - SD (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Dengue IgM/IgG
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Bóc vỏ nhôm lấy thanh thử đặt lên bề mặt phẳng
2.3	Nhỏ bệnh phẩm vào giếng nhỏ bệnh phẩm hình tròn (S). Chờ cho huyết thanh thấm hút hết vào phần thấm bệnh phẩm ở giếng tròn.
2.4	Giữ cho lọ buffer thẳng đứng và cao hơn giếng hình chữ nhật khoảng 1 cm, nhỏ 2 giọt buffer vào giếng hình chữ nhật ở phần đầu của thanh thử.
2.5	Đọc kết quả sau 15 phút - 20 phút <u>Lưu ý:</u> Mọi kết quả đọc sau quá 20 phút đều không có giá trị và phải thử nghiệm lại.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Việc đánh giá kết quả cần dựa vào kết quả phối hợp của vạch thử nghiệm IgM, IgG và vạch chứng.

*** Nhiễm trùng tiên phát**

Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgM và vùng chứng → Thử nghiệm dương tính với kháng thể IgM và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue tiên phát.

*** Nhiễm trùng thứ phát**

- Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgM, IgG và vùng chứng → Kháng thể IgM và IgG dương tính và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue thứ phát.
- Vạch màu hồng xuất hiện ở vùng IgG và vùng chứng → Kháng thể IgG dương tính và gợi ý tới một nhiễm trùng dengue thứ phát.

*** Âm tính**

Vạch màu hồng chỉ xuất hiện ở vùng chứng → Không phát hiện được kháng thể IgM và IgG kháng dengue. Kiểm tra lại sau 3 - 4 ngày nếu nghi ngờ có nhiễm virus dengue.

*** Không có giá trị**

Không thấy vạch màu hồng xuất hiện ở vùng chứng → Thử nghiệm không có giá trị và cần phải làm lại.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Đọc kết quả sau quá 20 phút dễ gây phản ứng dương tính giả → Nên có đồng hồ đặt giờ để đọc kết quả đúng giờ qui định.

130. Dengue virus IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu kháng virus dengue dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 µl đến 1000 µl.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán**	Test	16,000
5	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,100
6	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,100
7	Ngoại kiểm (nếu có)*		0.020
8	Đầu côn 1000 µl	Cái	3,000
9	Đầu côn 200 µl	Cái	5,000

10	Giấy thấm	Cuộn	0,100
11	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
12	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
13	Bút viết kính	Cái	0,020
14	Bút bi	Cái	0,010
15	Mũ	Cái	0,020
16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	0,100
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
20	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
21	Dung dịch nước rửa tay	ml	1,000
22	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
23	Khăn lau tay	Cái	0,010

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).

** Nếu chỉ làm 01 mẫu vẫn phải mở 01 lọ kháng nguyên đủ cho 16 giếng bao gồm 11 mẫu bệnh phẩm + 5 mẫu chứng. Vì vậy nếu làm đơn lẻ 01 mẫu thì 01 bệnh phẩm phải chịu chi phí cho 15 giếng còn lại

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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Dengue Duo IgM capture ELISA - Pan Bio (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính dengue IgM
2.1	Để Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng kháng nguyên
2.5	Pha loãng huyết thanh người bệnh, chứng âm, chứng dương và

	chứng cut-off
2.6	Trộn đều lượng kháng nguyên đã được pha loãng với một lượng tương đương Mab Tracer. Phức hợp Antigen - Mab Tracer để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ
2.7	Cho chứng âm, chứng dương, chứng cut-off và bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng của phiến nhựa theo thứ tự hướng dẫn của quy trình
2.8	Đậy phiến nhựa và ủ
2.9	Rửa phiến nhựa
2.10	Lắc nhẹ phức hợp Antigen - Mab Tracer . Nhỏ phức hợp này vào mỗi giếng
2.11	Đậy phiến nhựa và ủ
2.12	Rửa phiến nhựa
2.13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
2.14	Ủ phiến nhựa, không đậy và tránh ánh sáng
2.15	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng.
2.16	Đọc độ kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Kết quả được tính theo Đơn vị PanBio như sau:

- Tính giá trị trung bình của ngưỡng (calibrator) rồi nhân với yếu tố ngưỡng (calibration factor = 0,62). Đây chính là giá trị ngưỡng:

$$CO = 0,62 \times \frac{ODCO1 + ODCO2 + ODCO3}{3}$$

$$- \text{Đơn vị Panbio} = 10 \times \frac{OD \text{ bệnh phẩm}}{OD \text{ giá trị ngưỡng}}$$

- ♣ Đơn vị PanBio < 9: mẫu thử âm tính, trong huyết thanh không có kháng thể IgM.
- ♣ Đơn vị PanBio = 9 - 11: mẫu thử phải xét nghiệm lại
- ♣ Đơn vị PanBio > 11: mẫu thử dương tính, trong huyết thanh người bệnh có kháng thể IgM.

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 quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

131. Dengue virus IgG miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng virus dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng virus dengue dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 µl đến 1000 µl.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Dây garô	Cái	0,001
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán**	Test	16,000
5	Chứng ngoại kiểm âm	ml	0,100
6	Chứng ngoại kiểm dương	ml	0,100
7	Ngoại kiểm (nếu có)*		0.020
8	Đầu côn 1000 µl	Cái	3,000
9	Đầu côn 200 µl	Cái	5,000

10	Giấy thấm	Cuộn	0,100
11	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
12	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
13	Bút viết kính	Cái	0,020
14	Bút bi	Cái	0,010
15	Mũ	Cái	0,020
16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	0,100
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
20	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
21	Dung dịch nước rửa tay	ml	1,000
22	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
23	Khăn lau tay	Cái	0,010

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).*

*** Nếu chỉ làm 01 mẫu vẫn phải mở 01 lọ kháng nguyên đủ cho 16 giếng bao gồm 11 mẫu bệnh phẩm + 5 mẫu chứng. Vì vậy nếu làm đơn lẻ 01 mẫu thì 01 bệnh phẩm phải chịu chi phí cho 15 giếng còn lại*

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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Dengue Duo IgG capture ELISA - Pan Bio (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính dengue IgG
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng kháng nguyên
2.5	Pha loãng huyết thanh người bệnh, chứng âm, chứng dương và

	chứng cut-off
2.6	Trộn đều lượng kháng nguyên đã được pha loãng với một lượng tương đương Mab Tracer. Phức hợp Antigen - Mab Tracer để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ
2.7	Cho chứng âm, chứng dương, chứng cut-off và bệnh phẩm đã pha loãng vào các giếng của phiến nhựa theo thứ tự hướng dẫn của quy trình
2.8	Đậy phiến nhựa và ủ
2.9	Rửa phiến nhựa.
2.10	Lắc nhẹ phức hợp Antigen - Mab Tracer . Nhỏ phức hợp này vào mỗi giếng
2.11	Đậy phiến nhựa và ủ
2.12	Rửa phiến nhựa
2.13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
2.14	Ủ phiến nhựa, không đậy và tránh ánh sáng
2.15	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng.
2.16	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm. trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Kết quả được tính theo Đơn vị PanBio như sau:

- Tính giá trị trung bình của giá trị ngưỡng (cut-off)

$$OD\ CO = \frac{ODCO1 + ODCO2 + ODCO3}{3}$$

$$- \text{Đơn vị Pan Bio} = 10 \times \frac{OD \text{ bệnh phẩm}}{OD \text{ giá trị ngưỡng}}$$

- ♣ Đơn vị Pan Bio < 18: mẫu thử âm tính, trong huyết thanh không có kháng thể IgG.
- ♣ Đơn vị Pan Bio = 18 - 22: mẫu thử phải xét nghiệm lại lần 2.
- ♣ Đơn vị Pan Bio > 22: mẫu thử dương tính, trong huyết thanh có kháng thể IgG.

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 quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

132. Dengue virus PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen đặc trưng của virus dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để xác định sự có mặt gen đặc trưng của virus dengue bằng kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Côn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách RNA từ virus	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1	ml	0,0001
14	Primer 2	ml	0,0001
15	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
16	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Thạch	Gam	0.075
24	Ladder	ml	0.0025
25	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
26	Ethidium Bromide	ml	0.100
27	TAE Buffer	ml	0.100
28	Giấy thấm	Cuộn	0,100
29	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
30	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
31	Bút viết kính	Cái	0,020
32	Bút bi	Cái	0,010
33	Mũ	Cái	0,020
34	Khẩu trang	Cái	0,020
36	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
37	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
38	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
39	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
40	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
41	Khăn lau tay	cái	0,010
42	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng RT-PCR

2.3. Thực hiện phản ứng PCR

2.4. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.5. Đánh giá 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 và có kích thước tương ứng với thang DNA chuẩn.

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 xét nghiệm.

133. Dengue virus serotype PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện DNA đặc trưng của virus dengue trong huyết thanh hoặc huyết tương ở người

2. Nguyên lý

Xác định serotype của virus dengue dựa trên nguyên lý của kỹ thuật one-step RT-PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy PCR
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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	1.000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1.000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1.000
11	Kit tách RNA	Test	2.000
12	ống Falcol 50 ml	Cái	0.010
13	Eppendorf 1,7 ml	Tube	2.000
14	Eppendorf 0,2 ml	Tube	2.000
15	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	2.000
16	Đầu côn 30 µl	Cái	1.200
17	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5.200
18	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3.200
19	Ethanol BDH	ml	2.000
20	Water-DEPC Treated	ml	1.000
21	Thạch	Gam	0.075
22	Ladder	ml	0.0025
23	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
24	Ethidium Bromide	ml	0.1
25	TAE Buffer	ml	0.1
26	Giấy thấm	Cuộn	0.100
27	Giấy xét nghiệm	Tờ	2.000
28	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0.001
29	Bút viết kính	Cái	0.020
30	Bút bi	Cái	0.010
31	Mũ	Cái	0.020
32	Khẩu trang	Cái	0.020
33	Găng không có bột tal	Đôi	0.500
34	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0.020
35	Quần áo bảo hộ	Bộ	0.005
36	Dung dịch nước rửa tay	ml	8.000
37	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1.000
38	Dung dịch khử trùng	ml	10.000
39	Khăn lau tay	Cái	0.010

* 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 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.

1. Lấy bệnh phẩm

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh: xem chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ kit one-step RT-PCR định type virus dengue (VD)

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng RT-PCR

2.3. Điện di và phát hiện sản phẩm

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có ít nhất một trong các vạch sản phẩm tương ứng với các type của virus dengue như sau:
 - Virus Dengue type 1: 482 cặp bazơ
 - Virus Dengue type 2: 119 cặp bazơ
 - Virus Dengue type 3: 290 cặp bazơ
 - Virus Dengue type 4: 392 cặp bazơ
- Chứng âm không có các vạch sản phẩm trên.

2. Phân tích mẫu

- Dựa vào độ dài dải băng để kết luận type virus dengue gây bệnh: những mẫu có vạch sản phẩm PCR tương ứng với 1 trong 4 type trên thì kết luận dương tính với virus dengue type đó.
- Những mẫu không có vạch sản phẩm nào thì kết luận không tìm thấy virus dengue.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Trong trường hợp không có sản phẩm PCR, chứng nội cũng không lên cần phải kiểm tra lại quá trình tách chiết RNA tổng số, chất lượng sinh phẩm, và thực hiện lại toàn bộ xét nghiệm.

134. CMV IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng cytomegalose virus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng cytomegalose virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzym) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 04 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Lọ	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 và kiểm tra chất lượng	Test	1,000
11	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,030
12	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,030
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Nước cất	ml	8,000
15	Đầu côn 1000 µl	Kg	1,050
16	Đầu côn 200 µl	ml	3,000
17	Giấy thấm	Cái	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Cái	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Cái	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Đôi	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Bộ	0,020
26	Quần áo bảo hộ	ml	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	Ống	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	Cái	1,000
29	Dung dịch khử trùng	Cái	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm Platelia CMV IgM - BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính CMV IgM
2.1	Đề sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Chuẩn bị phức hợp miễn dịch
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Pha loãng bệnh phẩm
2.7	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.8	Đậy tấm và ủ ở 37 ⁰ C trong 45 phút
2.9	Rửa phiến nhựa theo hướng dẫn của quy trình.
2.10	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.11	Đậy tấm và ủ ở 37 ⁰ C trong 45 phút
2.12	Rửa phiến nhựa
2.13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
2.14	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.15	Dùng phản ứng.
2.16	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- OD của giếng trống ≤ 0.150 .
- OD của mỗi cut-off luôn luôn trong khoảng 25% giá trị trung bình cut-off. Loại bỏ những giá trị không nằm trong khoảng này và tính toán lại giá trị trung bình.
- OD của chứng dương $\geq 1,5 \times \text{OD cut-off}$
- Tỷ lệ OD chứng âm : OD cut-off < 0.6 .
- OD cut-off ≥ 0.16 .

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

- Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

3. Diễn giải kết quả

- Nếu OD của mẫu bệnh phẩm $> \text{OD của cut-off}$: mẫu bệnh phẩm dương tính với CMV-IgM.

- Tính toán tỉ lệ giữa giá trị OD mẫu và OD cut-off.
 - + Dương tính: nếu tỉ lệ > 1.2
 - + Nghi ngờ: nếu tỉ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 20% OD của cut-off
 - + Âm tính: nếu tỉ lệ < 0.8
- Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ $\rightarrow$ yêu cầu lấy mẫu huyết thanh mới sau 2 – 3 tuần.

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 oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...).
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

135. CMV IgM miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng cytomegalose virus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng cytomegalose virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipet đơn kênh thể tích từ 50 µl đến 200 µl.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000

10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	2,000
12	Control	Test	0,100
13	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,150
14	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,150
15	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,02
16	Cleancell M	ml	3,000
17	Procell M	ml	3,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	Cái	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	Cuộn	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.

- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm CMV IgM Elecsys - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính CMV IgM
2.1	Vào Reagent để kiểm tra Số lượng tests.
2.2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
2.3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng.
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm
4	Chọn tên test là CMV IgM
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã chỉ định rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có).

3. Kết quả và báo cáo

- Âm tính: Nếu $COI < 0,7$
- Nghi ngờ: Nếu $0,7 \leq COI < 1,0$
- Dương tính: Nếu $COI \geq 1,0$

Những mẫu nghi ngờ cần kiểm tra lại lần 2. Nếu vẫn lặp lại kết quả lần đầu thì nên xét nghiệm lại với mẫu bệnh phẩm thứ hai sau 2 - 3 tuần.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ)→ Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chúng).

136. CMV IgG miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng cytomegalose virus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng cytomegalose virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 04 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Lọ	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
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000

5	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,000
6	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,030
7	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,030
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Nước cất	ml	8,000
10	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,050
11	Đầu cân 200 µl	Cái	3,000
12	Giấy thấm	Cuộn	0,100
13	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
14	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
15	Bút viết kính	Cái	0,020
16	Bút bi	Cái	0,010
17	Mũ	Cái	0,020
18	Khẩu trang	Cái	0,020
19	Găng tay	Đôi	0,100
20	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
21	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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

1. Lấy bệnh phẩm

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh: xem chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Platelina™ CMV IgG - BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính CMV IgG
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa

2.4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.5	Pha loãng bệnh phẩm với dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:101
2.6	Nhỏ chủng và mẫu huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.7	Đậy nắp và ủ
2.8	Rửa phiến nhựa.
2.9	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.10	Đậy nắp và ủ
2.11	Rửa phiến nhựa
2.12	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
2.13	Ủ, không đậy nắp và tránh ánh sáng
2.14	Dùng phản ứng.
2.15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm. trong vòng 30 phút sau khi dùng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- OD của chứng âm < 0.6
- OD của calibrator 2 $\geq$ 0.16
- OD của calibrator 5 $\geq$ 1,2
- OD của giếng trống $\leq$ 0,15
- Tỷ lệ OD chứng âm : OD cut-off < 0.6.
- OD cut-off $\geq$ 0.16.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

3. Diễn giải kết quả

Tính tỷ lệ giữa OD của mẫu bệnh phẩm : OD của calibrator 2

- + Dương tính: nếu tỷ lệ > 1.2
- + Nghi ngờ: nếu $0,8 \leq$ tỷ lệ $\leq$ 1.2
- + Âm tính: nếu tỷ lệ < 0.8

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 quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

137. CMV IgG miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng cytomegalose virus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Xác định nồng độ kháng thể IgG kháng cytomegalose virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 50 µl đến 200 µl.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100

11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	2,000
12	Control	Test	0,100
13	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,150
14	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,150
15	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
16	Cleancell M	ml	3,000
17	Procell M	ml	3,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	Cái	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	Cái	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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

1. Lấy bệnh phẩm

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh: xem chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm CMV IgM Elecsys - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định lượng CMV IgG
2.1	Vào Reagent để kiểm tra Số lượng tests.
2.2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
2.3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương và chứng ngoại kiểm (nếu có) vào sample cup tương ứng.
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm
4	Chọn tên test là CMV IgG
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

3. Kết quả và báo cáo

- Âm tính: Nếu $COI < 0,5$ U/ml
- Nghi ngờ: Nếu $0,5 \leq COI < 1.0$ U/ml → Kiểm tra lại. Nếu kết quả vẫn nghi ngờ thì 2 tuần sau lấy một mẫu bệnh phẩm mới để xét nghiệm lại.
- Dương tính: Nếu $COI \geq 1.0$ U/ml

* Dải định lượng: 0,25 - 500 U/ml

* Ngưỡng phát hiện: 0,25 U/ml

* Những mẫu có giá trị lớn hơn dải định lượng thì máy sẽ báo > 500 U/ml hoặc > 1000 U/ml đối với mẫu pha loãng 1:20

- Những mẫu có giá trị lớn hơn dải định lượng thì pha loãng mẫu với tỷ lệ 1:20.
- + Nếu pha loãng bằng tay:

Kết quả cuối cùng (U/ml) = giá trị đo được x độ pha loãng (20)

- + Nếu pha loãng trên máy: Máy sẽ tự động tính toán kết quả.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ)→ Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).

138. CMV PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen đặc trưng của Cytomegalovirus (CMV) trong huyết thanh, huyết tương, dịch não tủy...

2. Nguyên lý

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để xác định sự có mặt gen đặc trưng của Cytomegalovirus bằng kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1	ml	0,0001
13	Primer 2	ml	0,0001
14	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
15	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
16	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
17	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
18	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
19	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
20	Ethanol BDH	ml	0,500
21	Water-DEPC Treated	ml	2,000
22	Thạch	Gam	0.075
23	Ladder	ml	0.0025
24	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
25	Ethidium Bromide	ml	0.100
26	TAE Buffer	ml	0.100
27	Giấy thấm	Cuộn	0,100
28	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
29	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
31	Bút viết kính	Cái	0,020
32	Bút bi	Cái	0,010
33	Mũ	Cái	0,020
34	Khẩu trang	Cái	0,020
35	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
36	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
37	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
38	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
39	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
40	Khăn lau tay	cái	0,010
41	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 não tủy, các loại dịch khác, ...

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Đánh giá 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 và có kích thước tương ứng với thang DNA chuẩn.

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.

139. CMV Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen đặc trưng của Cytomegalovirus (CMV) trong huyết thanh, huyết tương, dịch não tủy....

2. Nguyên lý

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để xác định sự có mặt của gen đặc trưng cho Cytomegalovirus bằng kỹ thuật Real time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy Real-time PCR và hệ thống máy tính
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001

5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1	ml	0,0001
13	Primer 2	ml	0,0001
14	Probe	ml	0,0001
15	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
16	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 ul có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 ul	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 ul có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
31	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
32	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
33	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
34	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
35	Khăn lau tay	cái	0,010
36	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 não tủy, các loại dịch khác...

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng Real-time PCR

2.3. Phân tích và đánh giá kết quả

2.4. In và trả kết quả

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 chứng dương và chứng âm xuất hiện không đúng với diễn giải ở phần IV thì phải kiểm tra lại Master mix và chứng dương và quá trình tách DNA tổng số, sau đó làm 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

140. CMV đo tải lượng hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Đếm số lượng bản sao của CMV DNA trong một đơn vị thể tích huyết tương.

2. Nguyên lý

Đếm số lượng bản sao của CMV DNA trong một đơn vị thể tích huyết tương (copies/ml) dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Hệ thống máy tách chiết tự động (RNA, DNA) và định lượng COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan 48 Analyzer (Roche) (VD)

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

Thực hiện xét nghiệm 10 mẫu/lần.

STT	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	3,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,340
11	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
12	SPU	Cái	1,300
13	Tube-S	Cái	1,300
14	Tube-K	Cái	1,300
15	Tip-K	Cái	1,300
16	Kit CAP-G/CTM Wash Reagent 5.1 L	Test	1,300
17	Đầu côn 1000 µl	Cái	1,000
18	Đầu côn có lọc 1000 µl	Cái	1,300
19	Giấy thấm	Cuộn	0,100
20	Giấy xét nghiệm	Tờ	3,000
21	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
22	Bút viết kính	Cái	0,020
23	Bút bi	Cái	0,010
24	Mũ	Cái	0,020
25	Khẩu trang	Cái	0,020
26	Găng không có bột tal	Đôi	0,500
27	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
28	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
29	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
30	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
31	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
32	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 từ máu chống đông bằng EDTA.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC THỰC HIỆN

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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan CMV Test (Roche Diagnostics GmbH) (VD)

2.1 Tách chiết DNA vận hành máy COBAS® AmpliPrep

2.2 Khuếch đại DNA, đọc kết quả trên máy COBAS® TaqMan 48

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Kiểm tra chất lượng

Giá trị định lượng chấp nhận được nếu:

- Chứng âm là không phát hiện.
- Chứng nội cho giá trị Ct mong đợi.

Không nhận các kết quả của chứng không có giá trị khi xuất hiện thông báo lỗi:

- Chứng âm: Invalid
- Chứng dương thấp: Invalid, $<1.50E+02$ cp/ml, $>1.00E+07$ cp/ml, không phát hiện (Target Not Detected)
- Chứng dương cao: Invalid, $<1.50E+02$ cp/ml, $>1.00E+07$ cp/ml, không phát hiện (Target Not Detected)

2. Kết quả và báo cáo

Kết quả định lượng CMV DNA của máy COBAS TaqMan 48 được tính theo Đơn vị số copies/ml.

Giá trị tham số Ct (được định nghĩa là số chu kỳ ngưỡng tại đó huỳnh quang vượt ngưỡng cố định, để so sánh với chu kỳ ngưỡng của mẫu chứng chuẩn từ đó suy ra Số lượng DNA mẫu đưa vào phản ứng) cho CMV DNA và CMV QS DNA.

Các giá trị chứng của CMV có nồng độ trong giới hạn được thực hiện đồng thời với mẫu bệnh phẩm để thiết lập đường chuẩn, cho thấy mối tương quan giữa giá trị Ct và số log cp/ml.

Giá trị trên máy	Trả lời kết quả
Target Not Detected	Không phát hiện thấy CMV DNA
$<1.50E+02$ cp/ml	$<1.50 \times 10^2$ cp/ml
$\geq 1.50E+02$ cp/ml đến $\leq 1.00E+07$ cp/ml	nhận những kết quả trong giới hạn này $\geq 1.50 \times 10^2$ cp/ml đến $\leq 1.00 \times 10^7$ cp/ml
$>1.00E+07$ cp/ml	$>1.00 \times 10^7$ cp/ml
Invalid	Không giá trị, chạy lại mẫu

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

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

Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

141. CMV Avidity

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định ái tính của các kháng thể IgG kháng Cytomegalovirus trong huyết thanh và huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng Cytomegalovirus bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang (CLIA) để xác định ái tính của các kháng thể IgG kháng Cytomegalovirus.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 4°C - 8°C
- Tủ âm sâu (-20°C hoặc -70°C) (nếu có).
- Micropipette thể tích 50 µl - 200 µl

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	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
3	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000

4	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
5	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,000
7	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,010
8	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,010
9	Chứng nội kiểm	Test	0,100
10	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
11	Cleancell M	ml	3,000
12	Procell M	ml	3,000
13	Probe Wash M	ml	2,000
14	Preclean M	ml	2,000
15	Assay Tip/Cup E170	Chiếc	3,000
16	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
17	Nước cất	ml	5,000
18	Sample cup	Cái	1,000
19	Giấy thấm	Cuộn	0,100
20	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
21	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
22	Bút viết kính	Cái	0,020
23	Bút bi	Cái	0,010
24	Mũ	Cái	0,020
25	Khẩu trang	Cái	0,020
26	Găng tay	Đôi	0,100
27	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
28	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
29	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
30	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
31	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
32	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys CMV IgG Avidity (Roche) (VD)

Các bước	Xét nghiệm xác định CMV IgG Avidity
1	Để Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2	Để tối ưu hiệu năng XN nên tuân theo tờ hướng dẫn kèm theo bộ thuốc thử
3	Tham khảo hướng dẫn vận hành cho từng XN đặc hiệu tương ứng
4	Thiết bị tự động trộn các vi hạt trước khi sử dụng
5	Máy đọc thông số đặc hiệu của XN trên mã vạch của thuốc thử, trong trường hợp ngoại lệ nếu máy không đọc được mã vạch hãy nhập chuỗi 15 con số vào
6	Đưa thuốc thử đang lạnh về nhiệt độ 20 ⁰ C và đặt vào khay thuốc thử trên máy phân tích, tránh tạo bọt, hệ thống sẽ tự động điều hòa nhiệt độ của thuốc thử và tự động đóng/mở nắp chai
7	Đặt mẫu chuẩn hoàn nguyên lên vùng đặt mẫu, máy phân tích tự động ghi nhận tất cả thông tin cần thiết cho việc chuẩn XN, sau khi hoàn thành chuẩn, lưu trữ cal1 và cal2 ở 2 ⁰ C - 8 ⁰ C hoặc loại bỏ chúng
8	Kiểm tra chất lượng: sử dụng Elecsys Precicontrol CMV IgG Avidity, chạy các mẫu chứng với nồng độ khác nhau ít nhất 1 lần cho mỗi 24 giờ khi XN vẫn đang sử dụng và sau mỗi lần chuẩn định

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có).

3. Tính toán

- Máy phân tích tự động tính toán nồng độ chất phân tích trong mỗi mẫu đo dưới dạng U/ml
- Ái tính (Avi%) phải được tính toán thủ công:

$$\text{Avi}\% = (\text{kết quả đo xử lý DiLCMVAv (U/ml)}/\text{kết quả đo chứng (U/ml)}) \times$$

100%

Chỉ những mẫu cho phản ứng ở đo chứng (≥ 1.0 U/ml) có thể dùng để xác định ái tính (Avi%)

Nếu kết quả đo xử lý DiLCMVAv cho giá trị < 0.3 U/ml hãy tính toán ái tính (Avi%) với 0.3 U/ml

2. Diễn giải kết quả

Kết quả thu được với XN Elecsys CMV IgG Avidity được diễn giải như sau:

Ái tính	Diễn giải kết quả
< 45.0 Avi%	Ái tính thấp
45.0-54.9 Avi%	Vùng xám
≥ 55.0 Avi%	Ái tính cao

- Nếu kết quả vùng xám, khuyến cáo lấy lại mẫu trong khoảng thời gian thích hợp (khoảng 2-4 tuần sau) → làm lại xét nghiệm.

Các kết quả Elecsys CMV IgG Avidity nên được sử dụng kết hợp với bệnh sử, thăm khám lâm sàng và các kết quả XN khác như CMV IgG, CMV IgM đặc hiệu.

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).
- Các kết quả trên người bệnh HIV, người bệnh đang tham gia liệu pháp ức chế miễn dịch hay trên những người bệnh có các rối loạn khác dẫn đến ức chế miễn dịch thì nên thận trọng khi diễn giải kết quả
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

142. HSV 1 + 2 IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng herpes virus typ 1 và typ 2 trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng herpes virus typ 1 và typ 2 dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 04 mẫu/lần

STT	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 chúng, kiểm tra chất lượng	Test	1,000
11	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,030
12	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,030
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Nước cất	ml	8,000
15	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,050
16	Đầu cân 200 µl	Cái	3,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Platelia HSV 1 + 2 IgM - BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HSV IgM
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Chuẩn bị phức hợp miễn dịch
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.7	Đậy tấm và ủ
2.8	Rửa phiến nhựa.
2.9	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.10	Đậy tấm và ủ
2.11	Rửa phiến nhựa.
2.12	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
2.13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.14	Dùng phản ứng.
2.15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm. trong vòng 30 phút sau khi dùng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- OD của giếng trống ≤ 0.150 .
- OD của mỗi cut-off phải luôn trong khoảng 25% giá trị trung bình cut-off. Loại bỏ những giá trị bất thường và tính toán lại giá trị trung bình.
- OD của chứng dương $\geq 1,5 \times$ OD cut-off
- Tỷ lệ OD chứng âm: OD cut-off < 0.6 .
- OD cut-off ≥ 0.16 ở 450/620 nm.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

3. Diễn giải kết quả

- Nếu OD của mẫu bệnh phẩm $>$ OD của cut-off: mẫu bệnh phẩm dương tính với HSV-IgM.
- Tính toán tỷ lệ giữa giá trị OD mẫu và OD cut-off.
 - + Dương tính: nếu tỷ lệ > 1.2
 - + Nghi ngờ: nếu tỷ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 20% của cut-off
 - + Âm tính: nếu tỷ lệ < 0.8
- Nếu kết quả nghi ngờ $\rightarrow$ làm lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ $\rightarrow$ yêu cầu lấy mẫu huyết thanh mới sau 2 – 3 tuần.

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 quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

3. HSV 1+ 2 IgG miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng herpes virus typ 1 và typ 2 trong huyết thanh người.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng herpes virus typ 1 và typ 2 dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 04 mẫu/lần

STT	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	1,000
11	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,030
12	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,030
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Nước cất	ml	8,000
15	Đầu cân 1000 µl	Cái	1,050
16	Đầu cân 200 µl	Cái	3,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm Platelia HSV 1 + 2 IgG - BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính HSV IgG
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Chuẩn bị phức hợp miễn dịch.
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.7	Đậy tấm và ủ
2.8	Rửa phiến nhựa
2.9	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.10	Đậy tấm và ủ
2.11	Rửa phiến nhựa.
2.12	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
2.13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.14	Dừng phản ứng.
2.15	Đọc kết quả 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

- OD của giếng trống ≤ 0.150 .
- OD của mỗi cut-off phải luôn trong khoảng 25% giá trị trung bình cut-off. Loại bỏ những giá trị bất thường và tính toán lại giá trị trung bình.
- OD của chứng dương $\geq 1,5 \times \text{OD cut-off}$
- Tỷ lệ giữa OD chứng âm và OD cut-off < 0.6 .
- OD cut-off ≥ 0.16

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

3. Diễn giải kết quả

- Nếu OD của mẫu bệnh phẩm > OD của cut-off: mẫu bệnh phẩm dương tính với HSV IgG.
- Tính toán tỉ lệ giữa giá trị OD mẫu : OD cut-off.
 - + Dương tính: nếu tỉ lệ > 1.2
 - + Nghi ngờ: nếu tỉ lệ nhỏ hơn hoặc lớn hơn 20% của Cut-off
 - + Âm tính: nếu tỉ lệ < 0.8
- Nếu kết quả nghi ngờ → làm lại xét nghiệm. Nếu vẫn nghi ngờ → yêu cầu lấy mẫu huyết thanh mới sau 2 - 3 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 dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

144. HSV Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện DNA đặc trưng của virus herpes trong dịch não tủy, dịch vết loét hoặc mảnh sinh thiết.

2. Nguyên lý

Phát hiện DNA đặc trưng của virus herpes dựa trên nguyên lý của kỹ thuật real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Bơm kim tiêm 10 ml	Cái	1,000
3	Lọ vô trùng	Cái	1,000
4	Cồn	ml	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	Găng không có bột tal	Đôi	0,010
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,200
11	Kit tách DNA	Test	2,200
12	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
13	ống Falcol 50ml	Cái	0,010
14	Eppendorf 1,7ml	Tube	2,200
15	Eppendorf 0,2ml	Tube	2,200
16	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	2,200
17	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
18	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
19	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
20	Giấy thấm	Cuộn	0,100
21	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
23	Bút viết kính	Cái	0,020
24	Bút bi	Cái	0,010
19	Mũ	Cái	0,020
21	Khẩu trang	Cái	0,020
22	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
23	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
26	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
27	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 vết loét, 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: xem chi tiết phụ lục 3.

- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm HSV rPCR Mix (VD)

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

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
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube HSV rPCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM 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 FAM 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 và bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu từ sau chu kỳ 36 → 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.

3. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân

Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

145. VZV Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của Varicella zoster virus (VZV) trong dịch não tủy, dịch vết loét hoặc mảnh sinh thiết ở người.

2. Nguyên lý

Xác định gen đặc trưng của Varicella zoster virus (VZV) dựa trên nguyên lý của kỹ thuật real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Tăm bông vô trùng	Cái	1,000
2	Tube đựng bệnh phẩm vô trùng	Cái	1,000
3	Găng không có bột tal	Đôi	0,100
4	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001

5	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001
6	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
7	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,200
8	Kit tách DNA	Test	2,200
9	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
10	ống Falcol 50 ml	Cái	0,010
11	Eppendorf 1,7 ml	Tube	2,200
12	Eppendorf 0,2 ml	Tube	2,200
13	Đầu cân 10 µl có lọc	Cái	2,200
14	Đầu cân 30 µl	Cái	1,200
15	Đầu cân 200 µl có lọc	Cái	5,200
16	Đầu cân 1 ml có lọc	Cái	3,200
17	Water-DEPC Treated	ml	1,000
18	Giấy thấm	Cuộn	0,100
19	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
20	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
21	Bút viết kính	Cái	0,020
22	Bút bi	Cái	0,010
23	Mũ	Cái	0,020
24	Khẩu trang	Cái	0,020
25	Găng tay không bột tal	Đôi	0,100
26	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
27	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
28	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
29	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
30	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
31	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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

Dịch não tủy, dịch vết loét hoặc 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: xem chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Real-time PCR định tính Varicella zoster virus (VD)

2.1. Tách chiết DNA

Có thể dùng kit tách chiết DNA bằng hoá chất phenol/chloroform hoặc tách chiết bằng cột của các nhà sản xuất khác như Qiagen, Stratec, Roche...

2.2. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube VZV rPCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “CY5” và “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu CY5 dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính hoặc âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu CY5 âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính

2. Phân tích mẫu

- Những mẫu dương tính chỉ cần chọn màu CY5 để phân tích, không cần quan tâm đến chứng nội, chứng nội có thể dương hoặc âm.
- Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự.

3. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân

Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

146. EBV-VCA IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng lại kháng nguyên vỏ capsid của Epstein Barr Virus (Epstein Barr Virus Viral Capsid Antigen - EBV VCA)

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng EBV VCA dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 µl đến 1000 µl.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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	0,050
12	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,050
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Nước cất	ml	8,000
15	Đầu cân 1000 µl	Cái	2,000
16	Đầu cân 200 µl	Cái	6,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Platelia™ EBV-VCA IgM - BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính EBV VCA IgM
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ chứng và huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.7	Đậy tấm và ủ
2.8	Rửa
2.9	Nhỏ chất cộng hợp
2.10	Đậy tấm và ủ.
2.11	Rửa
2.12	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.14	Dừng phản ứng
2.15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính độ hấp thụ trung bình

- Tính giá trị trung bình của các calibrator (CO trung bình). Loại bỏ những calibrator có giá trị lớn hơn giá trị trung bình 25 % và tính lại giá trị trung bình này.
- Yếu tố hiệu chỉnh (Correction Factor-CF): Yếu tố này thay đổi ở mỗi lô hóa chất và được in trên lọ calibrator.

2. Giá trị ngưỡng (CO)

$$CO = CF \times CO \text{ trung bình}$$

3. Tính tỷ số tình trạng miễn dịch (Immune Status Ratio-ISR) cho mỗi bệnh phẩm

$$\text{ISR} = \text{OD bệnh phẩm} : \text{OD CO}$$

4. Điều kiện của phản ứng

- OD blank < 0,15
- OD chứng âm ≤ 0.25 .
- OD calibrator $\geq 0,25$
- OD chứng dương R4b $\geq 0,5$
- ISR cho chứng âm, chứng dương I và chứng dương II phải nằm trong khoảng mong đợi của nhà sản xuất được in trên lọ hóa chất.

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

5. Diễn giải kết quả

- Dương tính: nếu $\text{ISR} \geq 1.1$
- Nghi ngờ: nếu $0.91 \leq \text{ISR} \leq 1.09 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm
- Âm tính: nếu $\text{ISR} \leq 0.90$

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 oxy hóa (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dừng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

147. EBV-VCA IgG miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên vỏ capsid của Epstein Barr Virus (Epstein Barr Virus Viral Capsid Antigen - EBV VCA)

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng EBV VCA dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	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	0,050
12	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,050
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Nước cất	ml	8,000
15	Đầu côn 1000 µl	Cái	2,000
16	Đầu côn 200 µl	Cái	6,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm Platelia™ EBV-VCA IgG-BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính EBV VCA IgG
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.7	Đậy tấm và ủ
2.8	Rửa
2.9	Nhỏ chất cộng hợp
2.10	Đậy tấm và ủ
2.11	Rửa
2.12	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.14	Dừng phản ứng
2.15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính độ hấp thụ trung bình

- Tính giá trị trung bình của các calibrator (CO trung bình). Loại bỏ những calibrator có giá trị lớn hơn giá trị trung bình 15 % và tính lại giá trị trung bình này.
- Yếu tố hiệu chỉnh (Correction Factor -CF): Yếu tố này thay đổi ở mỗi lô hóa chất và được in trên lọ calibrator.

2. Giá trị ngưỡng (CO)

$$CO = CF \times CO \text{ trung bình}$$

3. Tính tỷ số tình trạng miễn dịch (Immune Status Ratio-ISR) cho mỗi bệnh phẩm

$$ISR = OD \text{ bệnh phẩm} : OD \text{ CO}$$

4. Điều kiện của phản ứng

- OD blank < 0,15
- OD chứng âm ≤ 0.25 .
- OD calibrator $\geq 0,25$
- OD chứng dương R4b $\geq 0,5$
- ISR cho chứng âm, chứng dương I và chứng dương II phải nằm trong khoảng mong đợi của nhà sản xuất được in trên lọ hóa chất

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

5. Diễn giải kết quả

- Dương tính: nếu $ISR \geq 1.1$
- Nghi ngờ: nếu $0.91 \leq ISR \leq 1.09 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm.
- Âm tính: nếu $ISR \leq 0.90$

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 quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

148. EBV EA-D IgG miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên sớm của Epstein Barr Virus trong huyết thanh hoặc huyết tương người (Epstein Barr Virus Early Antigen Diffuse - EBV EA-D)

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng EBV EA-D dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 µl đến 1000 µl.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	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	0,050
12	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,050
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Nước cất	ml	8,000
15	Đầu cân 1000 µl	Cái	2,000
16	Đầu cân 200 µl	Cái	6,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,001

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm Platelia™ EBV EA-D IgG-BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính EBV EA-D IgG
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.7	Đậy tấm và ủ
2.8	Rửa
2.9	Nhỏ chất cộng hợp
2.10	Đậy tấm và ủ
2.11	Rửa
2.12	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.14	Nhỏ dung dịch dừng phản ứng
2.15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính độ hấp thụ trung bình

- Tính giá trị trung bình của các calibrator (CO trung bình). Loại bỏ những calibrator có giá trị lớn hơn giá trị trung bình 15 % và tính lại giá trị trung bình này.
- Yếu tố hiệu chỉnh (Correction Factor-CF): Yếu tố này thay đổi ở mỗi lô hóa chất và được in trên lọ calibrator.

2. Giá trị ngưỡng (CO)

$$CO = CF \times CO \text{ trung bình}$$

3. Tính tỷ số tình trạng miễn dịch (Immune Status Ratio-ISR) cho mỗi bệnh phẩm

$$\text{ISR} = \text{OD bệnh phẩm} : \text{OD CO}$$

4. Điều kiện của phản ứng

- OD blank < 0,15
- OD chứng âm ≤ 0.25 .
- OD calibrator $\geq 0,25$
- OD chứng dương R4b $\geq 0,5$
- ISR cho chứng âm, chứng dương I và chứng dương II phải nằm trong khoảng mong đợi của nhà sản xuất được in trên lọ hóa chất

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

5. Diễn giải kết quả

- Dương tính: nếu $\text{ISR} \geq 1.1$
- Nghi ngờ: nếu $0.91 \leq \text{ISR} \leq 1.09 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm.
- Âm tính: nếu $\text{ISR} \leq 0.90$

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 quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

149. EBV EB-NA IgG miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên nhân của Epstein-Barr virus trong huyết thanh hoặc huyết tương người (Epstein-Barr Nuclear Antigen-1 - EBV EB-NA-1)

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng EBV EB-NA-1 dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 µl đến 1000 µl.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	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	0,050
12	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,050
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Nước cất	ml	8,000
15	Đầu cân 1000 µl	Cái	2,000
16	Đầu cân 200 µl	Cái	6,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Platelia™ EB-NA-1 IgG – BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính EB-NA-1 IgG
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Pha loãng chứng và mẫu bệnh phẩm
2.5	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.7	Đậy tấm và ủ
2.8	Rửa
2.9	Nhỏ chất cộng hợp
2.10	Đậy tấm và ủ
2.11	Rửa
2.12	Nhỏ dung dịch hiện màu
2.13	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.14	Dừng phản ứng
2.15	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính độ hấp thụ trung bình

-Tính giá trị trung bình của các calibrator (CO trung bình). Loại bỏ những calibrator có giá trị lớn hơn giá trị trung bình 15 % và tính lại giá trị trung bình này.

-Yếu tố hiệu chỉnh (Correction Factor-CF): Yếu tố này thay đổi ở mỗi lô hóa chất và được in trên lọ calibrator.

2. Giá trị ngưỡng (CO)

$$CO = CF \times CO \text{ trung bình}$$

3. Tính tỷ số tình trạng miễn dịch (Immune Status Ratio-ISR) cho mỗi bệnh phẩm

$$ISR = OD \text{ bệnh phẩm} : OD \text{ CO}$$

4. Điều kiện của phản ứng

- OD blank < 0,15
- OD chứng âm $\leq$ 0.25.
- OD calibrator $\geq$ 0,25

- OD chứng dương R4b $\geq 0,5$

- ISR cho chứng âm, chứng dương I và chứng dương II phải nằm trong khoảng mong đợi của nhà sản xuất được in trên lọ hóa chất

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

5. Diễn giải kết quả

+ Dương tính: nếu $ISR \geq 1.1$

+ Nghi ngờ: nếu $0.91 \leq ISR \leq 1.09 \rightarrow$ làm lại xét nghiệm

+ Âm tính: nếu $ISR \leq 0.90$

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 quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

150. EBV PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen đặc trưng của Epstein-Barr virus trong máu, dịch não tủy và các loại dịch khác.

2. Nguyên lý

Xác định sự có mặt gen của gen đặc trưng cho Epstein-Barr virus (EBV) bằng kỹ thuật PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất

2.1. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy PCR
- Bộ lưu điện
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA từ virus	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1	ml	0,0001
14	Primer 2	ml	0,0001
15	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
16	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Thạch	Gam	0.075
24	Ladder	ml	0.0025
25	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
26	Ethidium Bromide	ml	0.100
27	TAE Buffer	ml	0.100
28	Giấy thấm	Cuộn	0,100
29	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
30	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
31	Bút viết kính	Cái	0,020
32	Bút bi	Cái	0,010
33	Mũ	Cái	0,020
34	Khẩu trang	Cái	0,020
35	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
36	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
37	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
38	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
39	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
40	Khăn lau tay	cái	0,010
41	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 não tủy, các loại dịch khác, ...

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Đánh giá 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 và có kích thước tương ứng với thang DNA chuẩn.

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 toàn bộ xét nghiệm.

151. EBV Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen đặc trưng của Epstein-Barr virus (EBV) trong máu, dịch não tủy và các loại dịch khác.

2. Nguyên lý

Phát hiện gen đặc trưng của EBV dựa trên nguyên lý của kỹ thuật real time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

2.2. Dụng cụ, hóa chất và vật tư tiêu hao

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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	1,000
9	Găng không có bột tal	Đôi	0,001
10	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,000
12	Kit tách DNA	Test	2,000
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Ống Falcol 50 ml	Cái	0,010
15	Eppendorf 1,7 ml	Tube	2,200
16	Eppendorf 0,2 ml	Tube	2,200
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	2,200
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
25	Ethanol BDH	ml	2,000
26	Water-DEPC Treated	ml	1,000
27	Giấy thấm	Cuộn	0,100
28	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
29	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
30	Bút viết kính	Cái	0,020
31	Bút bi	Cái	0,010
32	Mũ	Cái	0,020
33	Khẩu trang	Cái	0,020
34	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
35	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
36	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
37	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
38	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
39	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 hoặc máu toàn phần chống đông EDTA, dịch não tủy, các loại dịch khác....

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu 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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm EBV Real-time PCR (VD)

2.1. Tách chiết DNA

2.2. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube EBV rPCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

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

2. Phân tích mẫu

- Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng và bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước, kết luận “Mẫu dương tính”.

- Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu từ sau chu kỳ 36, kết luận “Mẫu nghi ngờ” và đề nghị lấy mẫu lại để thực hiện xét nghiệm hoặc thực hiện lại xét nghiệm sau 1-3 tháng.

- Mẫu có đường biểu diễn âm tính, kết luận “Không tìm thấy virus trong mẫu”. Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự.

3. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân

Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

152. EV71 PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen đặc trưng của Enterovirus 71 (EV 71) trong các loại dịch tiết đường hô hấp, các loại dịch khác và phân.

2. Nguyên lý

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để xác định sự có mặt của gen đặc trưng cho Enterovirus 71 bằng kỹ thuật OneStep RT-PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2.
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Micropipette

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001

5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1	ml	0,0001
13	Primer 2	ml	0,0001
14	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
15	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
16	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
17	Đầu côn 30 µl có lọc	Cái	1,200
18	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
19	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
20	Ethanol BDH	ml	0,500
21	Water-DEPC Treated	ml	2,000
22	Thạch	Gam	0.075
23	Ladder	ml	0.0025
24	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
25	Ethidium Bromide	ml	0.100
26	TAE Buffer	ml	0.100
27	Giấy thấm	Cuộn	0,100
28	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
29	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
30	Bút viết kính	Cái	0,020
31	Bút bi	Cái	0,010
32	Mũ	Cái	0,020
33	Khẩu trang	Cái	0,020
34	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
36	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
37	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
38	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
39	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
40	Khăn lau tay	cái	0,010
41	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 hầu họng, dịch đường hô hấp, phân, các loại dịch khác, ...

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng RT-PCR

2.3. Thực hiện phản ứng PCR

2.4. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.5. Đánh giá 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 và có kích thước tương ứng với thang DNA chuẩn.

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.

153. EV71 Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen đặc trưng của Enterovirus 71 (EV71) từ bệnh phẩm dịch não tủy, phết họng, phết trực tràng.

2. Nguyên lý

Phát hiện gen đặc trưng của Enterovirus 71 dựa trên nguyên lý của kỹ thuật real-time RT-PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất

2.1. Trang thiết bị

- Máy realtime PCR và hệ thống máy vi tính
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette các thể tích từ 5 µl -1000 µl

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu /lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Tăm bông vô trùng	kg	0,001
2	Găng không bột tal	cái	0,500
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy	Test	1,200

	chứng, kiểm tra chất lượng		
7	Kit tách chiết DNA	Test	2,200
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	Ống Falcol 50 ml	Cái	0,010
10	Eppendorf 1,7 ml	Tube	2,200
11	Eppendorf 0,2 ml	Tube	2,200
12	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
13	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
14	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
15	Đầu côn 1ml có lọc	Cái	3,200
16	Water-DEPC treated	ml	1,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
25	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
26	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
27	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
28	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
29	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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, phết họng, phết trực tràng

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh: xem chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm EV/EV71 RT TQ PCR Kit (VD)

2.1. Thu nhận mẫu

Thu nhận mẫu và lưu mẫu trước khi tách chiết theo quy định

2.2. Tách chiết RNA

Tách chiết RNA tổng số

2.3. Tổng hợp cDNA

Thực hiện phản ứng RT với môi ngẫu nhiên phiên mã ngược RNA trong dịch tách chiết RNA

2.4. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay đá lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng dương và chứng âm hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube EV/EV 71 rPCR mix. Xong đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình Real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đặt trên máy real-time PCR
- Chọn màu “FAM” , “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động.
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM và màu HEX tuyến tính vượt quá tín hiệu nền (đường biểu diễn dương tính)
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM và màu HEX âm tính
- Chứng nội tại có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính

2. Phân tích mẫu

- Mẫu dương tính EV: Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng với màu của từng tác nhân và bắt đầu từ chu kỳ 40 trở về trước.
- Mẫu nghi ngờ: Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu sau chu kỳ 40, đề nghị lấy mẫu lại để thực hiện xét nghiệm.
- Mẫu âm tính: Mẫu có đường biểu diễn âm tính, chứng nội phải dương tính.

4. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT CẦN XỬ TRÍ

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân: Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.
- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

154. EV71 genotype giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định trình tự nucleotide đặc trưng cho từng genotype của Enterovirus 71 (EV 71) trong các loại dịch tiết đường hô hấp, các loại dịch khác và phân.

2. Nguyên lý

Xác định trình tự nucleotide đặc trưng cho từng genotype của EV71 bằng kỹ thuật giải trình tự gen.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Primer 2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 3 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Primer 4 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
17	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
18	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
19	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
20	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
21	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
22	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
23	Ethanol BDH	ml	0,500
24	Water-DEPC Treated	ml	2,000
25	Thạch	Gam	0.075
26	Ladder	ml	0.0025
27	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
28	Ethidium Bromide	ml	0.100
29	TAE Buffer	ml	0.100
30	Giấy thấm	Cuộn	0,100
31	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
32	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
33	Bút viết kính	Cái	0,020
34	Bút bi	Cái	0,010
35	Mũ	Cái	0,020
36	Khẩu trang	Cái	0,020
37	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
38	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
39	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
40	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000

41	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
42	Khăn lau tay	cái	0,010
43	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 hầu họng, dịch đường hô hấp, phân, và các loại dịch khác...

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng RT-PCR

2.3. Thực hiện phản ứng PCR

2.4. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.5. Giải trình tự gen

2.6. Kiểm tra và so sánh trình tự gen của EV71 trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 gen đích không bị nhiễu và phải có độ tương đồng $\geq 90\%$ mới có thể kết luận được genotype của EV71

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.

- 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.

155. Enterovirus PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen đặc trưng của Enterovirus trong các loại bệnh phẩm phân, đờm, dịch phế quản....

2. Nguyên lý

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để xác định sự có mặt gen đặc trưng của Enterovirus bằng kỹ thuật OneStep RT-PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000

4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khâu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1	ml	0,0001
14	Primer 2	ml	0,0001
15	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
16	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Thạch	Gam	0.075
24	Ladder	ml	0.0025
25	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
26	Ethidium Bromide	ml	0.100
27	TAE Buffer	ml	0.100
28	Giấy thấm	Cuộn	0,100
29	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
30	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
31	Bút viết kính	Cái	0,020
32	Bút bi	Cái	0,010
33	Mũ	Cái	0,020
34	Khẩu trang	Cái	0,020
35	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
36	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
37	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
38	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
39	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
40	Khăn lau tay	cái	0,010
41	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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, dịch phế quản, phân, mủ, dịch não tủy, các loại dịch khác, ...

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện RT-PCR và PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Đánh giá 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 và có kích thước tương ứng với thang DNA chuẩn.

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 của primers và master mix, và thực hiện lại xét nghiệm.

156. Enterovirus genotype giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định trình tự nucleotide đặc trưng cho từng genotype của Enterovirus trong các loại dịch tiết đường hô hấp, các loại dịch khác và phân.

2. Nguyên lý

Xác định trình tự nucleotide đặc trưng với từng genotype của Enterovirus bằng kỹ thuật giải trình tự gen.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
13	Primer 2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Primer 3 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 4 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
17	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
18	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
19	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
20	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
21	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
22	Ethanol BDH	ml	0,500
23	Water-DEPC Treated	ml	2,000
24	Thạch	Gam	0.075
25	Ladder	ml	0.0025
26	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
27	Ethidium Bromide	ml	0.100
28	TAE Buffer	ml	0.100
29	Giấy thấm	Cuộn	0,100
30	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
31	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
32	Bút viết kính	Cái	0,020
33	Bút bi	Cái	0,010
34	Mũ	Cái	0,020
35	Khẩu trang	Cái	0,020
36	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
37	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
38	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
39	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
40	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
41	Khăn lau tay	cái	0,010
42	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 hầu họng, dịch đường hô hấp, phân, và các loại dịch khác

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng RT-PCR

2.3. Thực hiện phản ứng PCR

2.4. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.5. Giải trình tự gen

2.6. Kiểm tra và so sánh trình tự gen của EV trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 gen đích không bị nhiễu và phải có độ tương đồng $\geq 90\%$ mới có thể kết luận được genotype của EV

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.

- 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.

157. Adenovirus Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của Adenovirus từ bệnh phẩm (dịch viêm kết mạc mắt, dịch đường hô hấp...)

2. Nguyên lý

Xác định gen đặc trưng của Adenovirus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipettes các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Tăm bông vô trùng	Cái	1,000
2	Găng không có bột tal	Đôi	0,100
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001

5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,200
7	Kit tách DNA	Test	2,200
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	ống Falcol 50 ml	Cái	0,010
10	Eppendorf 1,7 ml	Tube	2,200
11	Eppendorf 0,2 ml	Tube	2,200
12	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	2,200
13	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
14	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
15	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
16	Water-DEPC Treated	ml	1,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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

Dịch viêm kết mạc mắt, dịch đường hô hấp...

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm Real-time PCR định tính Adenovirus

2.1. Tách chiết DNA

Có thể dùng kit tách chiết DNA bằng hoá chất phenol/chloroform hoặc tách chiết bằng cột của các nhà sản xuất khác như Qiagen, Stratec, Roche...

2.2. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube Adenovirus rPCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “CY5” và cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu CY5 dương tính hoặc âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu CY5 dương tính

2. Phân tích mẫu

- Những mẫu dương tính chỉ cần chọn màu FAM để phân tích, không cần quan tâm đến chứng nội, chứng nội có thể dương hoặc âm.
- Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự.

3. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

- 1. Nguyên nhân:** Có thể mẫu âm thật sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.

- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

158. BK/JC virus PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện *JC/BK* virus trong bệnh phẩm máu và dịch não tủy, nước tiểu.

2. Nguyên lý

Xác định định tính và định lượng gen đặc trưng virus *JC/BK* bằng kỹ thuật real-time PCR

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất

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 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	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	1,000
9	Găng không có bột tal	Đôi	2,000
10	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,100
12	Kit tách DNA	Test	2,100
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	ống Falcol 50 ml	Cái	0,010
15	Eppendorf 1,7 ml	Tube	2,100
16	Eppendorf 0,2 ml	Tube	2,100
17	Đầu cân 10 µl có lọc	Cái	6,000
18	Đầu cân 200 µl có lọc	Cái	12,000
19	Đầu cân 1 ml có lọc	Cái	6,000
20	Ethanol BDH	ml	2,000
21	Water-DEPC Treated	ml	1,000
22	Giá đỡ PCR tube	Cái	0,001
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
31	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
32	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
33	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
34	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
35	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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, nước tiểu, huyết tương, 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

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh: xem chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Geno-Sen JC/BK Virus (Rotor Gene) Real-time PCR (VD)

2.1. Tách chiết DNA

2.2. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Lấy đủ số tube 0,2 ml cần dùng.
- Chuẩn bị MasterMix (bao gồm JC/BK Mix, Mg. Sol JC/BK, IC) và phân phối vào các tube 0,2 ml.
- Cho Standards, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube PCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “JOE” cho mẫu, Standards và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Các chứng chuẩn có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu JOE dương tính hoặc âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu JOE dương tính.

2. Phân tích mẫu định tính

- Mẫu có đường biểu diễn dương tính rõ ràng và bắt đầu từ chu kỳ 36 trở về trước, kết luận “Mẫu dương tính”.
- Mẫu có đường biểu diễn dương tính và bắt đầu từ sau chu kỳ 36, kết luận “Mẫu nghi ngờ” và đề nghị lấy mẫu lại để thực hiện xét nghiệm.
- Mẫu có đường biểu diễn âm tính, kết luận “Không tìm thấy virus trong mẫu”. Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự.

3. Phân tích mẫu định lượng

- Mẫu chuẩn (JC/BK Standard - S 1-5) để định lượng được cung cấp trong bộ kit đã biết trước nồng độ, được tính theo copies/ml và được xử lý cùng một phương pháp với mẫu bệnh phẩm.

• Standard 1: 10^5 copies/ml	=	25.000.000 copies/ml
• Standard 2: 10^4 copies/ml	=	2.500.000 copies/ml
• Standard 3: 10^3 copies/ml	=	250.000 copies/ml
• Standard 4: 10^2 copies/ml	=	25.000 copies/ml
• Standard 5: 10^1 copies/ml	=	2.500 copies/ml

- Áp dụng công thức sau để qui đổi giá trị đã được xác định của mẫu bệnh phẩm sang copies/ml bằng cách sử dụng đường cong chuẩn:

$$\text{Kết quả (copies/ml)} = \frac{\text{Kết quả đo được (copies/ml)} \times \text{Thể tích mẫu tách chiết } (\mu\text{l})}{\text{Thể tích bệnh phẩm (ml)}}$$

4. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Ống giữ mẫu máu được gắn chất chống đông có thể ức chế phản ứng PCR
- Khi sử dụng phương pháp tách chiết trong đó có bước dùng buffer để loại bỏ ethanol, phải thực hiện thêm bước ly tâm trước khi tiến hành bước thôi rửa để loại bỏ ethanol còn sót lại. Điều này giúp ngăn ngừa sự ức chế phản ứng PCR.
- Để dựng thành đường chuẩn, phải sử dụng tất cả mẫu chuẩn (JC/BK S 1-5).
- Trước khi sử dụng, tất cả thuốc thử cần phải được rửa đông hoàn toàn và hòa trộn với nhau (pipet và vortex ngắn)

159. HPV PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của Human papillomavirus (HPV) từ bệnh phẩm dịch đường sinh dục.

2. Nguyên lý

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để xác định sự có mặt gen đặc trưng của HPV bằng kỹ thuật PCR

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Côn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1	ml	0,0001
13	Primer 2	ml	0,0001
14	Eppendorf 1,7 ml	Tube	3,000
15	Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
16	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
17	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
18	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
19	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
20	Ethanol BDH	ml	0,500
21	Water-DEPC Treated	ml	2,000
22	Thạch	Gam	0.075
23	Ladder	ml	0.0025
24	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
25	Ethidium Bromide	ml	0.100
26	TAE Buffer	ml	0.100
27	Giấy thấm	Cuộn	0,100
28	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
29	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
30	Bút viết kính	Cái	0,020
31	Bút bi	Cái	0,010
32	Mũ	Cái	0,020
33	Khẩu trang	Cái	0,020
34	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
35	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
36	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
37	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
38	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
39	Khăn lau tay	cái	0,010
40	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 đường sinh dục, các loại dịch khác, ...

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA tổng số

2.2. Thực hiện PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Đánh giá 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 và có kích thước tương ứng với thang DNA chuẩn.

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 toàn bộ xét nghiệm.

160. HPV Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của Human papillomavirus (HPV) từ bệnh phẩm đường sinh dục.

2. Nguyên lý

Xác định gen đặc trưng của HPV dựa trên nguyên lý của kỹ thuật real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc -70⁰C)
- Micropipette các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Tăm bông vô trùng	Kg	0,001
2	Găng không có bột tal	Đôi	0,001
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001

5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,200
7	Kit tách DNA	Test	2,200
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	ống Falcol 50 ml	Cái	0,010
10	Eppendorf 1,7 ml	Tube	2,200
11	Eppendorf 0,2 ml	Tube	2,200
12	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	2,200
13	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
14	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
15	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
16	Water-DEPC Treated	ml	1,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 quệt cổ tử cung, 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: xem chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm HPV Real-time PCR (VD)

2.1. Tách chiết DNA

Có thể dùng kit tách chiết DNA bằng hoá chất phenol/chloroform hoặc tách chiết bằng cột của các nhà sản xuất khác như Qiagen, Stratec, Roche...

2.2. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Thực hiện bước này với các tube PCR mix được giữ trong khay lạnh hoặc đá đang tan.
- Chỉ lấy đủ số tube PCR mix cần. Trước và sau khi đặt phản ứng PCR phải ly tâm tube để tất cả dung dịch nằm dưới đáy tube.
- Cho chứng +, chứng - hoặc dịch DNA tách chiết vào từng tube HPV rPCR Mix. Xong, đặt các tube vào máy real-time PCR.
- Khởi động máy real-time PCR. Khởi động máy tính và chương trình real-time PCR.
- Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy real-time PCR.
- Chọn màu “FAM” và “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
- Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy real-time PCR hoạt động
- Lưu file dữ liệu vào máy tính
- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

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

2. Phân tích mẫu

- Những mẫu dương tính chỉ cần chọn màu FAM để phân tích, không cần quan tâm đến chứng nội, chứng nội có thể dương hoặc âm.
- Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự.

3. In đồ thị kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Có mẫu và chứng nội cũng đều âm tính. Chứng bình thường, có mẫu dương, mẫu âm thật sự.

1. Nguyên nhân

Có thể mẫu âm thực sự, có thể phản ứng PCR bị ức chế.

2. Khắc phục

- Pha loãng mẫu từ 10-100 lần, thực hiện lại toàn bộ thí nghiệm từ bước tách chiết. Sau khi có kết quả phải nhân thêm với hệ số pha loãng mẫu. Nếu vẫn gặp sự cố trên, lấy lại mẫu theo đúng yêu cầu.
- Trừ những mẫu sự cố, tất cả các mẫu bình thường đều có thể lấy kết quả.

161. HPV Genotype Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định genotype của Human Papillomavirrus (HPV) trong bệnh phẩm đường sinh dục.

2. Nguyên lý

Xác định genotype của HPV và dựa trên nguyên lý của kỹ thuật real-time PCR và reverse dot blot.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính.
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm dung cho tube 0,2 ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C)
- Micropipette các thể tích từ 5 µl - 1000 µl.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Tăm bông vô trùng	Cái	1,000
2	Găng không có bột tal	Đôi	0,100
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001

4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,200
7	Kit tách DNA	Test	2,200
8	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
9	ống Falcol 50 ml	Cái	0,010
10	Eppendorf 1,7 ml	Tube	2,200
11	Eppendorf 0,2 ml	Tube	2,200
12	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	2,200
13	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
14	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	5,200
15	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
16	Water-DEPC Treated	ml	1,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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

Dịch quệt cổ tử cung, 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: xem chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm HPV Genotype Real-time PCR (VD)

2.1. Tách chiết DNA

2.2. Thực hiện phản ứng real-time PCR

2.3. *Thực hiện phản ứng reverse dot blot*: thực hiện với những mẫu dương tính ở bước 2.2

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Chứng dương: có tín hiệu tại vị trí chứng dương
- Những genotyp nguy cơ cao: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.
- Những genotyp nguy cơ thấp: 6, 11, 42, 43, 61, 81.

2. Nhận định kết quả

- Mẫu có tín hiệu tròn xanh xuất hiện tại vị trí tương ứng với genotype nào thì kết luận mẫu dương tính với genotype đó. Một mẫu có thể đồng nhiễm nhiều genotype.
- Mẫu không có tín hiệu màu thì kết luận: “Mẫu nhiễm HPV genotype khác ngoài genotype của bộ kit”.

3. In hình kết quả

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Tất cả các mẫu đều dương tính kể cả chứng âm.

- **Nguyên nhân 1:** Lô thí nghiệm bị ngoại nhiễm DNA hoặc sản phẩm PCR từ môi trường của khu vực thao tác hoặc nhiễm chéo giữa các mẫu.

Khắc phục: Chiếu UV và vệ sinh khu vực thao tác bằng nước Javel để khử nhiễm. Tiến hành lại thí nghiệm thật cẩn thận.

- **Nguyên nhân 2:** Kit bị ngoại nhiễm DNA hoặc sản phẩm PCR trong quá trình sử dụng.

Khắc phục: Thay kit mới và thực hiện quá trình như hướng dẫn ở nguyên nhân 1.

Trường hợp này không thể lấy kết quả, phải khắc phục và tiến hành lại thí nghiệm.

2. Tín hiệu dương tính yếu, có thể do rửa nhiều và quá lâu làm cho tín hiệu dương tính nhạt hoặc màng lai không sạch vẫn còn màu xanh sẽ khó đọc kết quả.

Khắc phục: Phải tuân thủ đúng điều kiện rửa

162. HPV genotype PCR hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định genotype của human papiloma virus (HPV) trong bệnh phẩm đường sinh dục.

2. Nguyên lý

Xác định genotype của HPV và dựa trên nguyên lý của kỹ thuật real-time PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy tách chiết tự động, máy khuếch đại và phát hiện tự động
- Hệ thống máy tính.
- Bộ lưu điện
- Máy vortex
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (-20⁰C) hoặc (-70⁰C)
- Micropipette 1000 µl.

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

Thực hiện xét nghiệm 22 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Lọ vô trùng có chứa môi trường bảo quản	Cái	1,000
2	Dụng cụ lấy bệnh phẩm quệt cổ tử cung	Cái	1,000
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm	Test	0,100

	tra chất lượng		
7	Kit tách DNA1	Test	1,100
8	Kit tách DNA2		1,100
9	Kit tách DNA3	Cái	1,100
10	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
11	Elution plate	Cái	0,050
12	Extraction plate	Cái	0,050
13	Máng đựng hóa chất to 200 ml	Cái	0,050
14	Máng đựng hóa chất nhỏ 50 ml	Cái	0,200
15	Ngoại kiểm (nếu có)		
16	Tip CORE TIPS w. Filter 1 ml	Cái	10,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng không có bột tal	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 sinh dục, mẫu quét cổ tử cung, mảnh sinh thiết được chứa trong các dung dịch bảo quản mẫu.

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm COBAS 4800 HPV-Roche (VD)

2.1. Tách chiết DNA bằng máy tự động

2.2. Khuếch đại HPV-DNA và đọc kết quả bằng máy tự động

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Điều kiện của phản ứng

- Giá trị định type chấp nhận được nếu :
 - Chứng âm: Valid (Không phát hiện DNA ở bất kỳ kênh nào)
 - Chứng dương: Valid (phát hiện DNA ở cả 4 kênh: kênh cho type 16, 18, nhóm nguy cơ cao và beta-globin)
- Không nhận kết quả nếu chứng âm hoặc chứng dương invalid

2. Phân tích mẫu

- Kết quả định type HPV sẽ cho ra cụ thể bị nhiễm HPV 16, HPV 18 hoặc bị nhiễm một trong 12 type nguy cơ cao 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.

- Kết quả của mẫu bệnh phẩm được diễn giải như sau:

+ Khi chọn xét nghiệm là HPV High Risk Panel

Cobas® 4800 HPV test	Diễn giải kết quả
HR HPV POS	High Risk HPV Positive Kết quả dương tính với một hoặc nhiều type HPV
HR HPV NEG	High Risk HPV Negative Kết quả HPV âm tính
Invalid	High Risk HPV Invalid Kết quả không có giá trị, mẫu cần xét nghiệm lại.

+ Khi chọn xét nghiệm là HPV High Risk Panel Plus Genotyping

Cobas® 4800 HPV Test	Kết quả báo cáo và diễn giải
Other HR HPV POS, HPV16 POS, HPV18 POS	Other High Risk HPV Positive, HPV16 Positive, HPV18 Positive. Mẫu dương tính với HPV type 16 và 18 và một hoặc nhiều loại HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.
Other HR HPV POS, HPV16 POS, HPV18 NEG	Other High Risk HPV Positive, HPV 16 Positive, HPV 18 Negative Mẫu dương tính với HPV type 16 và một hoặc nhiều loại HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Không phát hiện HPV type 18 hoặc HPV type 18 dưới ngưỡng phát hiện

Other HR HPV POS, HPV16 NEG, HPV18 POS	Other High Risk HPV Positive, HPV16 Negative*, HPV18 Positive. Mẫu dương tính với HPV type 18 và một hoặc nhiều loại HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Không phát hiện HPV type 16 hoặc HPV type 16 dưới ngưỡng phát hiện
Other HR HPV POS, HPV16 NEG, HPV18 NEG	Other High Risk HPV Positive, HPV16 Negative*, HPV18 Negative. Mẫu dương tính với một hoặc nhiều loại HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Không phát hiện HPV type 16 và HPV type 18 hoặc HPV type 16 và HPV type 18 dưới ngưỡng phát hiện.

IV. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

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

163. HPV genotype giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định genotype của Human papillomavirus (HPV) từ dịch đường sinh dục.

2. Nguyên lý

Xác định genotype của HPV bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide trên gen đặc trưng.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy vortex
- Máy ủ nhiệt
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Bộ lưu điện
- 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột tal	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết DNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
13	Primer 2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Primer 3 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 4 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
17	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
18	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
19	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
20	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
21	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
22	Ethanol BDH	ml	0,500
23	Water-DEPC Treated	ml	2,000
24	Thạch	Gam	0.075
25	Ladder	ml	0.0025
26	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
27	Ethidium Bromide	ml	0.100
28	TAE Buffer	ml	0.100
29	Giấy thấm	Cuộn	0,100
30	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
31	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
32	Bút viết kính	Cái	0,020
33	Bút bi	Cái	0,010
34	Mũ	Cái	0,020
35	Khẩu trang	Cái	0,020
36	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
37	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
38	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
39	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
40	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
41	Khăn lau tay	cái	0,010
42	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

** 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 đường sinh dục, các loại dịch khác...

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng 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 của HPV trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 gen đích không bị nhiễu và phải có độ tương đồng $\geq 90\%$ mới có thể kết luận được genotype của HPV

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.
- 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.

164. Influenza virus A, B test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện virus cúm typ A và typ B trong bệnh phẩm đường hô hấp.

2. Nguyên lý

Phát hiện và phân biệt kháng nguyên của virus cúm typ A và typ B dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Đồng hồ bấm giây

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
2	Panh	Cái	0,0001
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	0,200
7	Axit ngâm rửa	ml	10,000
8	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
9	Mũ	Cái	0,020
10	Khẩu trang	Cái	0,020
11	Găng tay	Đôi	2,000
12	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
13	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
14	Bút viết kính	Cái	0,020

15	Bút bi	Cái	0,010
16	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
17	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
18	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
19	Khăn lau tay	Cái	0,010
20	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Dịch tỵ hầu, dịch họng của người 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm SD Bioline Influenza Antigen (VD)

2.1. Dùng que tăm bông lấy dịch tỵ hầu hoặc dịch họng

2.2. Đặt que lấy mẫu vào ống đựng mẫu, ghi mã bệnh phẩm tương ứng

2.2. Nhỏ dung dịch pha loãng vào ống đựng mẫu, trộn đều với bệnh phẩm

2.3. Đặt thanh xét nghiệm vào ống đựng mẫu theo đúng vạch quy định

2.4. Đọc kết quả sau 10 – 15 phút

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Kết quả được chấp nhận khi xuất hiện màu rõ ràng, sắc nét ở vạch chứng C

- + Dương tính cúm A: khi xuất hiện màu ở vạch C và vạch A
- + Dương tính cúm B: khi xuất hiện màu ở vạch C và vạch B
- + Âm tính: khi xuất hiện màu ở vạch chứng C và không xuất hiện màu ở các vạch còn lại.

+ Không có giá trị: vạch chứng C không xuất hiện sau 15-10 phút thì cần kiểm tra lại hóa chất, các bước thực hiện, làm lại test khác

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Đọc kết quả trước hoặc sau thời gian qui định có thể làm sai lệch kết quả.
- Test xét nghiệm cắm quá sâu, quá vạch qui định có thể làm kết quả sai lệch
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất

165. Influenza virus A, B Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen đặc trưng của virus cúm A và B trong bệnh phẩm đường hô hấp.

2. Nguyên lý

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của virus cúm A và B bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy Real-time PCR và hệ thống máy tính
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	Kg	0,001
2	Cồn	Ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001

6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1-1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
13	Primer 1-2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Probe 1	ml	0,0001
15	Primer 2-1(primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Primer 2-2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
17	Probe 2	ml	0,0001
18	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
19	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
20	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
21	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
22	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
23	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
24	Ethanol BDH	ml	0,500
25	Water-DEPC Treated	ml	2,000
26	Giấy thấm	Cuộn	0,100
27	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
28	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
29	Bút viết kính	Cái	0,020
30	Bút bi	Cái	0,010
31	Mũ	Cái	0,020
32	Khẩu trang	Cái	0,020
33	Găng tay	Đôi	0,100
34	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
35	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
36	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
37	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
38	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
39	Khăn lau tay	cái	0,010
40	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 hầu họng, dịch tỵ hầu, dịch súc họng, các loại dịch đường hô hấp dưới.

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng Real-time RT-PCR

2.3. Phân tích và đánh giá kết quả

2.4. In và trả kết quả

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 RNA 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

166. Influenza virus A, B giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện gen đặc trưng của influenza virus A và B trong bệnh phẩm đường hô hấp.

2. Nguyên lý

Xác định influenza virus A và B bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide của gen đặc trưng.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng

1	Bông	kg	0,001
2	Còn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Đôi	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
13	Primer 2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Primer 3 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 4 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
17	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
18	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
19	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
20	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
21	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
22	Ethanol BDH	ml	0,500
23	Water-DEPC Treated	ml	2,000
24	Thạch	Gam	0.075
25	Ladder	ml	0.0025
26	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
27	Ethidium Bromide	ml	0.100
28	TAE Buffer	ml	0.100
29	Giấy thấm	Cuộn	0,100
30	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
31	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
32	Bút viết kính	Cái	0,020
33	Bút bi	Cái	0,010
34	Mũ	Cái	0,020
35	Khẩu trang	Cái	0,020
36	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
37	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
38	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
39	Côn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
40	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
41	Khăn lau tay	cái	0,010
42	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 hầu họng, dịch ty hầu, dịch súc họng, các loại dịch đường hô hấp dưới.

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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện phản ứng RT-PCR

2.3. Thực hiện phản ứng PCR

2.4. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.5. Giải trình tự gen

2.6. Kiểm tra và so sánh trình tự gen của Influenza virus A, B trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 gen đích không bị nhiễu và phải có độ tương đồng $\geq 90\%$ mới có thể kết luận được Influenza virus A, B

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.

- 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.

167. JEV IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu với virus Viêm não Nhật Bản (*Japanese encephalitis virus* - JEV) trong huyết thanh, huyết tương hoặc dịch não tủy.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu với JEV bằng kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA
- Tủ lạnh 2⁰ - 8⁰ C
- Micropipette các loại
- Đồng hồ bấm giây
- Máy ly tâm thường

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

Thực hiện xét nghiệm 10 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Ống lấy bệnh phẩm	Ống	1,000
2	Bơm tiêm	Cái	1,000
3	Bông	Kg	0,001
4	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
5	Panh	Cái	0,0001
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
9	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm	Test	0,500

	tra chất lượng		
10	Đầu cân 1ml	cái	2,000
11	Đầu cân 100µl - 200 µl	Cái	3,000
12	Axit ngậm rửa	ml	10,000
13	Nước cất	ml	250,000
14	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	2,000
15	Mũ	Cái	0,020
16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	2,000
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
27	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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, 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

- Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh: xem chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm MAC-ELISA chẩn đoán viêm não nhật bản (Viện VSDT)

2.1. Chuẩn bị huyết thanh hoặc huyết tương hoặc dịch não tủy người bệnh theo hướng dẫn của nhà sản xuất

2.2. Chuẩn bị hóa chất: pha dung dịch rửa, chứng âm, chứng dương...

2.3. Viết sơ đồ mẫu

2.4. Nhỏ mẫu, chứng theo sơ đồ vào các giếng

2.5. Ủ mẫu

2.6. Rửa giếng, thêm kháng nguyên, ủ mẫu.

2.7. Rửa giếng, thêm cộng hợp, ủ mẫu

2.8. Rửa giếng, thêm cơ chất, ủ tránh ánh sáng

2.9. Thêm chất dừng phản ứng, đọc kết quả bằng máy đo quang

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Kết quả được chấp nhận khi giá trị OD của các giếng chứng đạt đủ điều kiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

+ Dương tính khi:

$$\text{OD mẫu xét nghiệm} / \text{OD chứng âm} \geq 2$$

+ Mẫu cần kiểm tra lại khi:

$$3 \times \text{OD chứng âm} < \text{OD mẫu xét nghiệm} < 5 \times \text{OD chứng âm}$$

+ Âm tính khi:

$$\text{OD mẫu xét nghiệm} \leq 3 \times \text{OD chứng âm}$$

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Đọc kết quả quá thời gian qui định sau khi dừng phản ứng.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

168. Measle virus Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus sởi trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng virus sởi dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD)

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Micropipette các loại
- Đồng hồ bấm giây

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

Thực hiện xét nghiệm 10 mẫu/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Ống lấy bệnh phẩm	Ống	1,000
2	Bơm tiêm	Cái	1,000
3	Bông	Kg	0,001
4	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
5	Panh	Cái	0,0001
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
9	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	0,500
10	Đầu côn 1ml	cái	2,000

11	Đầu cân 100μl - 200 μl	Cái	3,000
12	Axit ngâm rửa	ml	10,000
13	Nước cất	ml	250,000
14	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	2,000
15	Mũ	Cái	0,020
16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	2,000
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
27	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 của người 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Measles Platelia IgM - Biorad (VD)

2.1. Ly tâm ống bệnh phẩm, chuẩn bị huyết thanh hoặc huyết tương

2.2. Chuẩn bị hóa chất: pha dung dịch rửa, chứng âm, chứng dương...

2.3. Viết sơ đồ mẫu

2.4. Nhỏ dung dịch trung hòa, mẫu, chứng theo sơ đồ vào các giếng

2.5. Ủ mẫu

2.6. Rửa giếng, thêm cộng hợp, ủ mẫu

2.7. Rửa giếng, thêm cơ chất, ủ tránh sáng

2.8. Thêm chất dừng phản ứng, đọc kết quả bằng máy đo quang

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Kết quả được chấp nhận khi giá trị OD của các giếng chứng đạt đủ điều kiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Tính C.O theo hướng dẫn của nhà sản xuất
 - + Dương tính khi: $OD \text{ mẫu} > 1.2 * C.O$
 - + Mẫu cần kiểm tra lại khi:
$$C.O \leq OD \text{ mẫu xét nghiệm} \leq 1.2 * C.O$$
 - + Âm tính khi: $OD \text{ mẫu} < C.O$

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót: Có thể xảy ra hiện tượng âm tính giả hoặc dương tính giả, thường do:

- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn, nhiễm các tác nhân oxid hóa.
- Đọc kết quả quá 20 phút sau khi dừng phản ứng.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

169. Rotavirus test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng nguyên rota virus trong bệnh phẩm phân.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng nguyên rota virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Que tăm bông lấy bệnh phẩm.
- Ống nghiệm (được cung cấp sẵn trong bộ kit).
- Nước muối sinh lý.
- Đồng hồ bấm giây.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Tăm bông vô trùng	Cái	1,000
2	Lọ vô trùng	Cái	1,000
3	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
4	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,001
5	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
6	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,100
7	Giấy thấm	Cuộn	0,100
8	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
9	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
10	Bút viết kính	Cái	0,020
11	Bút bi	Cái	0,010
12	Mũ	Cái	0,020

13	Khẩu trang	Cái	0,020
14	Găng tay	Đôi	0,100
15	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
16	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
17	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
18	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
19	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
20	Khăn lau tay	Cái	0,010

3. Bệnh phẩm

Phân của người 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm chẩn đoán SD Bioline Rotavirus (VD).

Các bước	Xét nghiệm phát hiện Rota virus
1.	- Đưa test cần làm để ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi làm. Lấy thanh xét nghiệm cần thiết.
2.	- Hút hút dung dịch pha loãng bệnh phẩm theo hướng dẫn
3.	- Lấy khoảng 50 mg phân bằng que tăm bông vô trùng nhúng vào ống nghiệm có chứa dung dịch pha loãng.
4.	- Xoay tròn que tăm bông để bệnh phẩm hoà vào dung dịch pha loãng theo hướng dẫn. Đậy nắp ống nghiệm đã có bệnh phẩm lại.
5.	- Nhỏ dung dịch bệnh phẩm đã pha loãng vào giếng nhỏ bệnh phẩm (có chữ S).
6.	- Đọc kết quả sau 10-20 phút. Quá 20 phút, kết quả không có giá trị.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Âm tính: Chỉ 1 một đường màu xuất hiện ở vùng chứng C.
- Dương tính: 2 đường màu xuất hiện ở vùng chứng (C) và vùng thử nghiệm (T).
- Không có giá trị: Không thấy xuất hiện đường màu nào hoặc chỉ có một đường màu tại vùng thử nghiệm (T). Khi đó phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Âm tính giả: Lượng virus đào thải ra ngoài quá thấp, hoặc do sai sót trong quá trình lấy và xử lý mẫu.
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

170. RSV Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng RSV (*Respiratory syncytial virus*) trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng RSV (*Respiratory syncytial virus*) dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy ELISA
- Đồng hồ bấm giây
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Micropipette các loại

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

Thực hiện xét nghiệm 05 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Ống lấy bệnh phẩm	Ống	1,000
2	Bơm tiêm	Cái	1,000
3	Bông	Kg	0,001
4	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
5	Panh	Cái	0,0001
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
9	Khấu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	0,500

10	Đầu côn 1ml	cái	2,000
11	Đầu côn 100 μ l - 200 μ l	Cái	3,000
12	Axit ngậm rửa	ml	10,000
13	Nước cất	ml	250,000
14	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	2,000
15	Mũ	Cái	0,020
16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	2,000
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
27	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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.

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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Ly tâm ống bệnh phẩm, chuẩn bị huyết thanh hoặc huyết tương

2.2. Chuẩn bị hóa chất: pha dung dịch rửa, chứng âm, chứng dương...

2.3. Viết sơ đồ mẫu

2.4. Nhỏ dung dịch trung hòa, mẫu, chứng theo sơ đồ vào các giếng

2.5. Ủ mẫu

2.6. Rửa giếng, thêm cộng hợp, ủ mẫu

2.7. Rửa giếng, thêm cơ chất, ủ tránh sáng

2.8. Thêm chất dừng phản ứng, đọc kết quả

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Kết quả được chấp nhận khi giá trị OD của các giếng chúng đạt đủ điều kiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Tính C.O theo hướng dẫn của nhà sản xuất
 - + Dương tính khi: $OD_{mẫu} \geq C.O$
 - + Âm tính khi: $OD_{mẫu} < C.O$

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Chúng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn.
- Đọc kết quả quá thời gian qui định sau khi dừng phản ứng.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

171. RSV Real-time PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt gen đặc trưng của RSV (*Respiratory syncytial virus*) trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để xác định sự có mặt gen đặc trưng của RSV (*Respiratory syncytial virus*) bằng kỹ thuật Real-time RT - PCR

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy Real-time PCR và hệ thống máy tính
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001

6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1	ml	0,0001
13	Primer 2	ml	0,0001
14	Probe	ml	0,0001
15	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
16	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay	Đôi	0,100
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
36	Khăn lau tay	cái	0,010
37	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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 ngoáy họng, dịch đường hô hấp, các loại dịch khác ...

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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2.Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện Real-time RT-PCR

2.3. Phân tích và đánh giá kết quả

2.4. In và trả kết quả

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 positive control (PC) và negative (NC) xuất hiện không đúng với diễn giải ở phần IV thì phải kiểm tra lại Master mix và chứng dương và quá trình tách RNA 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

172. Rubella virus IgM miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng Rubella virus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng Rubella virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Dàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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 chất lượng	Test	2,000
11	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,100
12	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,100
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Nước cất	ml	2,000
15	Đầu cân 1000 µl	Cái	3,000
16	Đầu cân 200 µl	Cái	5,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm PlateliaTM Rubella IgM - BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Rubella IgM
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.5	Chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2.6	Pha loãng chứng và bệnh phẩm với dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:21
2.7	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.8	Đậy tấm và ủ
2.9	Rửa phiến nhựa.
2.10	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.11	Đậy tấm và ủ
2.12	Rửa phiến nhựa
2.13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
2.14	Ủ, không đậy tấm và tránh ánh sáng
2.15	Dùng phản ứng.
2.16	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dùng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính giá trị ngưỡng (CO):

CO = Trung bình cộng của các chứng ngưỡng (OD R4)

2. Tính tỷ số mẫu bệnh phẩm: Tỷ số bệnh phẩm = OD bệnh phẩm/CO

3. Điều kiện của phản ứng:

- $CO \geq 0,3$
- $0,8 \times CO < OD R4 \leq 1,2 \times CO$
(OD của mỗi giá trị R4 phải nhỏ hơn 20 % giá trị CO)
- $OD \text{ chứng âm (R3)}/CO \leq 0,3$
- $OD \text{ chứng dương (R5)}/CO \geq 1,5$

Nếu các chỉ số kiểm tra chất lượng không đáp ứng các điều kiện trên thì phải làm lại xét nghiệm.

4. Diễn giải kết quả

- + Âm tính: Tỷ số bệnh phẩm $< 0,8$
- + Nghi ngờ: $0,8 \leq \text{tỷ số bệnh phẩm} < 1 \rightarrow$ Yêu cầu làm lại xét nghiệm sau 3 tuần với một mẫu bệnh phẩm khác.
- + Dương tính: tỷ số bệnh phẩm ≥ 1

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 quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Tuân thủ đúng quy trình xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

173. Rubella virus IgM miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng rubella virus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng rubella virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette.

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000

10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	2,000
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,150
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,150
14	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
15	Control	Test	0,100
16	Cleancell M	ml	3,000
17	Procell M	ml	3,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	chiếc	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	Cái	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm Rubella IgM Elecsys - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định tính Rubella IgM
2.1	Vào Reagent để kiểm tra Số lượng tests
2.2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
2.3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1.	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
2.	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3.	Nhập mã bệnh phẩm
4.	Chọn tên test là Rubella IgM
5.	Vào Barcode Read Error
6.	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7.	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
8.	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

3. Kết quả và báo cáo

- Âm tính: Nếu $COI < 0.80$
- Nghi ngờ: Nếu $0.80 \leq COI < 1.0 \rightarrow$ cần phải kiểm tra lại
- Dương tính: Nếu $COI \geq 1.0$:

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ)→ Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).

174. Rubella virus IgG miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nồng độ kháng thể IgG kháng Rubella virus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Xác định nồng độ kháng thể IgG kháng Rubella virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ELISA (miễn dịch gắn enzyme) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Bàn máy ELISA
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C -8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 10 μ l đến 1000 μ l.
- Bộ pipetman 8 kênh (nếu có)

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần.

STT	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	2,000
11	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,100
12	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,100
13	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
14	Nước cất	ml	2,000
15	Đầu côn 1000 µl	Cái	3,000
16	Đầu côn 200 µl	Cái	5,000
17	Giấy thấm	Cuộn	0,100
18	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	0,100
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
27	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
29	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
30	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Platelia™ Rubella IgG - BioRad (VD)

Các bước	Xét nghiệm định lượng Rubella IgG
2.1	Đề Số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm
2.2	Đánh số, sắp xếp bệnh phẩm và viết sơ đồ theo thứ tự.
2.3	Chuẩn bị dung dịch rửa
2.4	Lấy đủ số giếng cần dùng và đặt vào giá.
2.5	Pha loãng chứng và bệnh phẩm với dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:21
2.6	Nhỏ chứng và mẫu huyết thanh người bệnh đã pha loãng
2.7	Đậy nắp và ủ
2.8	Chuẩn bị dung dịch cộng hợp
2.9	Rửa phiến nhựa.
2.10	Nhỏ chất cộng hợp vào mỗi giếng
2.11	Đậy nắp và ủ
2.12	Rửa phiến nhựa
2.13	Nhỏ dung dịch hiện màu vào mỗi giếng
2.14	Ủ, không đậy nắp và tránh ánh sáng
2.15	Dừng phản ứng.
2.16	Đọc kết quả ở bước sóng 450 và 620nm trong vòng 30 phút sau khi dừng phản ứng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Xây dựng đường cong chuẩn

- Sự xuất hiện và nồng độ của kháng thể Rubella IgG có trong mẫu bệnh phẩm sẽ được xác định bằng cách so sánh độ hấp thụ của mẫu bệnh phẩm với nồng độ tính theo Đơn vị quốc tế (IU/ml) của các giá trị ngưỡng của đường cong chuẩn theo tiêu chuẩn của WHO RUBI 1-94.

- Vẽ đường cong chuẩn:

+ Trục tung (Y): Chấm các giá trị OD của R3, R4a, R4b, R4c.

+ Trục hoành (X): Chấm các điểm biểu thị các giá trị nồng độ tương ứng của R3, R4a, R4b, R4c (IU/ml)

- Đối với mỗi mẫu bệnh phẩm, tính hiệu giá kháng thể Rubella IgG bằng cách xác định nồng độ tương ứng từ đường cong chuẩn vẽ được với độ hấp thụ đo được.

2. Điều kiện của phản ứng

- OD chứng ngưỡng 15 (R4a) $\geq 0,2$
- OD chứng ngưỡng 60 (R4b) $\geq 0,4$
- OD R4a/OD R3 (chứng ngưỡng 0) $\geq 0,5$
- OD R4b/OD R4a $\geq 1,5$
- OD chứng ngưỡng 200 (R4c)/OD R4b $\geq 1,2$

3. Diễn giải kết quả

- + Âm tính: nếu hiệu giá < 10 IU/ml
- + Nghi ngờ: nếu $10 \text{ IU/ml} \leq \text{hiệu giá} < 15 \text{ IU/ml}$
- + Dương tính: nếu hiệu giá $\geq 15 \text{ IU/ml}$

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 oxy hoá (thuốc tẩy, ion kim loại v.v...)
- Dung dịch dùng phản ứng bị nhiễm bẩn.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Tuân thủ đúng quy trình xét nghiệm
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dùng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.

175. Rubella virus IgG miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nồng độ kháng thể IgG kháng rubella virus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Xác định nồng độ kháng thể IgG kháng rubella virus dựa trên nguyên lý của kỹ thuật CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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

- Hệ thống máy miễn dịch tự động
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm thường.
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C hoặc - 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette đơn kênh thể tích từ 50 µl đến 200 µl..

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

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu/lần

STT	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	Test	0,001
8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000

10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	2,000
12	Control	Test	0,100
13	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,150
14	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,150
15	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
16	Cleancell M	ml	3,000
17	Procell M	ml	3,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	chiếc	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	ml	5,000
23	Sample cup	Cái	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.

- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Rubella IgG Elecsys - Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định lượng Rubella IgG
2.1	Vào Reagent để kiểm tra Số lượng tests
2.2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
2.3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
9.	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng
10.	Vào màn hình Workplace → Test Selection
11.	Nhập mã bệnh phẩm
12.	Chọn tên test là Rubella IgG
13.	Vào Barcode Read Error
14.	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
15.	Đặt mẫu huyết thanh người bệnh cần chạy đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
16.	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

3. Kết quả và báo cáo

- Âm tính: Nếu COI < 10 IU/ml
- Dương tính: Nếu COI ≥ 10 IU/ml

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ) → Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.

- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).

176. Rubella virus PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt của virus Rubella trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Xác định sự có mặt của gen đặc trưng cho virus Rubella bằng kỹ thuật RT-PCR

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Bộ lưu điện
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu bệnh phẩm/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000

4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khâu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách RNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1	ml	0,0001
13	Primer 2	ml	0,0001
14	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
15	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
16	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
17	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
18	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
19	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
20	Ethanol BDH	ml	0,500
21	Water-DEPC Treated	ml	2,000
22	Thạch	Gam	0.075
23	Ladder	ml	0.0025
24	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
25	Ethidium Bromide	ml	0.100
26	TAE Buffer	ml	0.100
27	Giấy thấm	Cuộn	0,100
28	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
29	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
30	Bút viết kính	Cái	0,020
31	Bút bi	Cái	0,010
32	Mũ	Cái	0,020
33	Khẩu trang	Cái	0,020
34	Găng tay	Đôi	0,100
35	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
36	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
37	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
38	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
39	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
40	Khăn lau tay	cái	0,010
41	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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

Chất tiết của đường hô hấp, máu, dịch não tủy, nước tiểu

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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện RT-PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Đánh giá 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 và có kích thước tương ứng với thang DNA chuẩn.

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.

177. Rubella virus giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định sự có mặt của virus Rubella trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Xác định virus Rubella bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide của đoạn gen đặc trưng.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm 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 2
- Máy PCR
- Bộ lưu điện
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ly tâm dùng cho tube 0,2 ml
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- 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)

Thực hiện xét nghiệm 02 mẫu bệnh phẩm/lần

STT	Chi phí hóa chất, vật tư tiêu hao	Đơn vị	Số lượng

1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột	Cái	0,500
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	1,350
11	Kit tách chiết RNA từ virus	Test	2,350
12	Primer 1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
13	Primer 2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Primer 3 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 4 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
17	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
18	Đầu côn 10 µl có lọc	Cái	1,000
19	Đầu côn 30 µl	Cái	1,200
20	Đầu côn 200 µl có lọc	Cái	2,200
21	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
22	Ethanol BDH	ml	0,500
23	Water-DEPC Treated	ml	2,000
24	Thạch	Gam	0.075
25	Ladder	ml	0.0025
26	Blue Juice Gel loading dye	ml	0.003
27	Ethidium Bromide	ml	0.100
28	TAE Buffer	ml	0.100
29	Giấy thấm	Cuộn	0,100
30	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
31	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
32	Bút viết kính	Cái	0,020
33	Bút bi	Cái	0,010
34	Mũ	Cái	0,020
35	Khẩu trang	Cái	0,020
36	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
37	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
38	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
39	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
40	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
41	Khăn lau tay	cái	0,010
42	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

* 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

Chất tiết của đường hô hấp, máu, dịch não tủy, nước tiểu

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 chi tiết phụ lục 3.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết RNA tổng số

2.2. Thực hiện RT-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 của virus Rubella trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 gen đích không bị nhiễu và phải có độ tương đồng $\geq 90\%$ mới có thể kết luận được virus Rubella

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.

- 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.

178. Hồng cầu, bạch cầu trong phân soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện hồng cầu, bạch cầu trong phân.

2. Nguyên lý

Nhận định hồng cầu, bạch cầu trong phân khi làm tiêu bản soi tươi dưới kính hiển vi quang học dựa trên hình thể, kích thước, và cấu tạo.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	1,000
4	Lá kính	Cái	2,000
5	Bông	Kg	0,001
6	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
7	Panh	Cái	0,0001
8	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
9	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Nước muối sinh lý	ml	5,000
11	Lugol	ml	2,000
13	Pipet nhựa	Cái	2,000
14	Axit ngậm lam	ml	10,000
15	Mũ	Cái	0,020
16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	3,000

18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Bật lửa	Cái	0,010
23	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
24	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
25	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
26	Khăn lau tay	Cái	0,010
27	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
28	QC (nếu thực hiện) *		0,1
29	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

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 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nhỏ dung dịch NaCL 9 % và dung dịch Lugol 1% lên trên một lam kính.

2.2. Dùng que lấy một lượng phân (bao kín đầu que) hòa đều với giọt NaCL 9 % đến khi có màu đục, làm tương tự đối với giọt Lugol 1%.

2.3. Đặt lá kính lên trên giọt dung dịch.

2.4. Quan sát kính hiển vi ở vật kính 40X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

- Hồng cầu: hình tròn kích thước 7-8 μ m màu hồng nhạt, trung tâm nhạt màu.

- Hồng cầu thoái hóa: bờ răng cưa không đều.
- Bạch cầu đa nhân hình tròn kích thước lớn 10 - 15 μ m.
- Bạch cầu đơn nhân hình tròn, bầu dục, đa giác kích thước 20 - 25 μ m.

2. Âm tính

Không tìm thấy hồng cầu, bạch cầu.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Nhỏ quá nhiều dung dịch lên lam kính.
- Làm tiêu bản quá dày hoặc quá mỏng.

2. Xử trí

Đặt tiêu bản trên tờ báo vẫn đọc được chữ là đạt. Nếu làm tiêu bản quá dày sẽ khó soi, làm mỏng quá sẽ bỏ sót không phát hiện được hồng cầu, bạch cầu.

179. Hồng cầu trong phân test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện hồng cầu trong phân.

2. Nguyên lý

Phát hiện hemoglobin trong phân dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Đồng hồ bấm giờ (nếu có)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Bông	Kg	0,001
4	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
5	Panh	Cái	0,0001
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Pipet nhựa	Cái	2,000
11	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
12	Mũ	Cái	0,020
13	Khẩu trang	Cái	0,020

14	Găng tay	Đôi	3,000
15	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
16	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
17	Bút viết kính	Cái	0,020
18	Bút bi	Cái	0,010
19	Bật lửa	Cái	0,010
20	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
21	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Khăn lau tay	Cái	0,010
24	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
25	QC (nếu thực hiện) *		0,1
26	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

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 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm chẩn đoán Hemosure iFOB Test.

2.1. Lấy thanh thử ra khỏi bao để ở nhiệt độ phòng .

2.2. Dùng que lấy bệnh phẩm (bao kín đầu que) nhúng que vào lọ dung dịch trong test thử, lắc đều.

2.3. Nhỏ 3 giọt dung dịch trên vào thanh thử.

2.4. Đọc kết quả trong vòng 5- 10 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

Xuất hiện 2 vạch trên thanh thử ở vị trí C và T.

2. Âm tính

Xuất hiện 1 vạch trên thanh thử ở vị trí C.

3. Không có giá trị

Không thấy xuất hiện vạch nào trên thanh thử. Phải tiến hành làm lại xét nghiệm với một thanh thử khác.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Đọc kết quả sau quá 10 phút dễ gây phản ứng dương tính giả. Nên có đồng hồ đặt giờ để đọc kết quả đúng giờ qui định.

180. Đơn bào đường ruột soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện đơn bào đường ruột gây bệnh (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Isospora belli*, *Trichomonas intestinalis*...) trong phân.

2. Nguyên lý

Đơn bào đường ruột gây bệnh được phát hiện qua hình thể, kích thước, tính chất di động và bắt màu trong môi trường có NaCl 9‰ và Lugol 1% soi dưới kính hiển vi quang học.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Lá kính	Cái	2,000
5	Bông	Kg	0,001
6	Cồn 90 ⁰ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
7	Panh	Cái	0,0001
8	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
9	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Nước muối sinh lý	ml	5,000
11	Lugol	ml	2,000
12	Pipet nhựa	Cái	2,000
13	Axit ngậm lam	ml	10,000
14	Mũ	Cái	0,020

15	Khẩu trang	Cái	0,020
16	Găng tay	Đôi	3,000
17	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
18	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
19	Bút viết kính	Cái	0,020
20	Bút bi	Cái	0,010
21	Bật lửa	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
27	QC (nếu thực hiện) *		0,1
28	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

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 4).

Lưu ý: - Không lấy phân làm XN khi uống thuốc Bismuth hoặc Barium.

- Mẫu phân làm xét nghiệm tránh lẫn nước tiểu.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nhỏ giọt dung dịch NaCL 9 % và giọt dung dịch Lugol 1% lên trên một lam kính.

2.2. Dùng que lấy một lượng phân (bao kín đầu que) hòa đều vào dung dịch NaCL 9 % đến khi có màu đục, làm tương tự đối với dung dịch Lugol.

2.3. Đặt lá kính lên trên dung dịch.

2.4. Quan sát kính hiển vi ở vật kính 40X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

Quan sát ở vật kính 40X tìm thể hoạt động và bào nang của đơn bào. Thể hoạt động của *Amip* kích thước 13-30µm chuyển động bằng chân giả.

- Thể hoạt động của *Giardia* hình thìa kích thước 9-21 x 5-15µm chuyển động bằng roi.
- *Trichomonas* hình quả lê kích thước 5-12 x 5-6µm chuyển động được nhờ các roi.
- Bào nang *Amip* hình tròn có vỏ dày bất màu vàng, kích thước trung bình 12µm bên trong có từ 2-4 nhân.
- Bào nang *Giardia* hình bầu dục kích thước 10-14 x 7-9µm, bên trong có từ 2-4 nhân có thể thấy vết roi cuộn lại trong bào nang.

2. Âm tính

Không thấy thể hoạt động, bào nang của đơn bào đường ruột.

Lưu ý

Trong trường hợp xét nghiệm lần đầu âm tính, để phát hiện KST gây bệnh có thể xét nghiệm 2 mẫu phân tiếp theo trong vòng từ 7-10 ngày.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Nhỏ quá nhiều dung dịch lên lam kính .
- Tiêu bản quá dày hoặc quá mỏng.

2. Xử trí

Đặt tiêu bản trên tờ báo vẫn đọc được chữ là đạt. Nếu làm tiêu bản quá dày sẽ khó soi, làm mỏng sẽ bỏ sót không phát hiện được đơn bào đường ruột.

181. Đơn bào đường ruột nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện đơn bào đường ruột gây bệnh (*Isospora belli*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*) trong phân.

2. Nguyên lý

Một số đơn bào đường ruột có đặc điểm kháng cồn/acid nên có thể được phát hiện bằng kỹ thuật nhuộm Ziehl-Neelsen.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Đồng hồ bấm giờ.

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Dầu soi kính	ml	1,000
4	Xylen lau kính	ml	1,000
5	Thuốc nhuộm đỏ Fucsin	ml	5,000
6	Axit H ₂ SO ₄	ml	10,000
7	Que cấy	Cái	1,000
8	Cồn tẩy 96 độ	ml	10,000
9	Thuốc nhuộm Xanh methylen	ml	5,000
10	Bông	Kg	0,001
11	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
12	Đèn cồn	Cái	0,0001
13	Panh	Cái	0,0001
14	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
15	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
16	Mũ	Cái	0,020

17	Khẩu trang	Cái	0,020
18	Găng tay	Đôi	3,000
19	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
20	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
21	Axit ngậm lam	ml	10,000
22	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
23	Bút viết kính	Cái	0,020
24	Bút bi	Cái	0,010
25	Bật lửa	Cái	0,010
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
28	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
29	Khăn lau tay	Cái	0,030
30	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
31	QC (nếu thực hiện) *		0,1
32	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

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 (xem Phụ lục 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Dùng que gỗ lấy phân phết lên lam kính, để khô.

2.2. Nhỏ dung dịch đỏ Fucsin phủ kín lên trên bệnh phẩm.

2.3. Rửa nước.

2.4. Tẩy màu bằng H₂SO₄ 5% đến khi hết màu đỏ.

2.5. Rửa nước

2.6. Nhỏ dung dịch xanh methylen.

2.7. Rửa nước.

2.8. Quan sát dưới kính hiển vi vật kính 10X- 100X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

- Nang trứng của *Cryptosporidium* hình tròn bắt màu đỏ kích thước từ 4- 6µm.
- Nang trứng của *Cyclospora* hình tròn bắt màu đỏ kích thước từ 8- 10µm.
- Nang trứng của *Isospora* hình bầu dục bắt màu đỏ kích thước 20- 30 X 10- 19µm.

2. Âm tính

Không tìm thấy đơn bào đường ruột.

Lưu ý: Trong trường hợp xét nghiệm lần đầu âm tính, để phát hiện KST gây bệnh có thể xét nghiệm 2 mẫu phân tiếp theo trong vòng từ 7-10 ngày.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

Tẩy chưa hết màu đỏ Fucsin.

2. Xử trí

Nếu bệnh phẩm dày để đủ thời gian nhưng vẫn còn màu đỏ Fucsin cần phải tẩy lại lần 2 bằng H₂SO₄ 5% đến khi bệnh phẩm phai hết màu đỏ.

182. Trứng giun, sán soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện trứng giun, sán trong phân.

2. Nguyên lý

Nhận định trứng giun, sán dựa vào hình thể, kích thước, cấu tạo và tính chất bắt màu khi soi tươi.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh – Ký sinh trùng

3. Phương tiện, hóa chất

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

2.1. Trang thiết bị

Kính hiển vi quang học

Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Lá kính	Cái	2,000
5	Bông	Kg	0,001
6	Cồn 90 ⁰ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
7	Panh	Cái	0,0001
8	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
9	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Nước muối sinh lý	ml	5,000
11	Lugol	ml	2,000
13	Pipet nhựa	Cái	2,000
14	Axit ngậm lam	ml	10,000
15	Mũ	Cái	0,020
16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	3,000
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001

20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Bật lửa	Cái	0,010
23	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
24	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
25	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
26	Khăn lau tay	Cái	0,010
27	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
28	QC (nếu thực hiện) *		0,1
29	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

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 (xem Phụ lục 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nhỏ dung dịch NaCL 9 ‰ và dung dịch Lugol 1% lên trên 1 lam kính.

2.2. Dùng que lấy một lượng phân (bao kín đầu que) hòa đều vào giọt dung dịch NaCL 9 ‰ đến khi có màu đục, làm tương tự đối với giọt dung dịch Lugol 1%.

2.3. Đặt lá kính lên trên giọt dung dịch.

2.4. Quan sát kính hiển vi ở vật kính 10X- 40X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

- Trứng giun đũa hình tròn hoặc bầu dục kích thước 35-50 x 45-75 μ m, ngoài cùng là lớp albumin xù xì bắt màu vàng, vỏ dày, trong là khối nhân sẫm màu. Ngoài ra có thể còn gặp trứng giun đũa mất tầng albumin.
- Trứng giun đũa không thụ tinh hình bầu dục kích thước 43- 47 x 85-95 μ m. Vỏ mỏng ít xù xì bên trong có những tế bào hoàng thể.

- Trứng giun móc hình bầu dục kích thước 40-60 μ m màu trong vỏ mỏng, trong là khối nhân phân chia từ 2-4 phần .
- Trứng giun tóc hình bầu dục, kích thước 22-50 μ m giống hình quả cau, màu vàng vỏ dày, 2 cực có 2 nắp.
- Trứng sán lá gan nhỏ bất màu vàng hình bầu dục một đầu có nắp một đầu có gai, kích thước 27-35 x 12-19 μ m.
- Trứng sán lá gan lớn hình bầu dục kích thước lớn từ 130-150 X 63-90 μ m, màu vàng nhạt vỏ mỏng, một đầu có nắp.
- Trứng sán lá phổi hình bầu dục màu vàng nâu sẫm kích thước lớn từ 80-120 X 50- 70 μ m, ở đầu có nắp trong trứng thấy có 1 đám tế bào.
- Trứng sán dây hình tròn vỏ dày màu nâu sẫm kích thước từ 36-51 μ m.

2. Âm tính

Không thấy trứng giun, sán.

Lưu ý

Trong trường hợp xét nghiệm lần đầu âm tính, để phát hiện KST gây bệnh có thể xét nghiệm 2 mẫu phân tiếp theo trong vòng từ 7-10 ngày.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Nhỏ quá nhiều dung dịch lên lam kính .
- Làm tiêu bản quá dày hoặc quá mỏng.

2. Xử trí

Đặt tiêu bản trên tờ báo vẫn đọc được chữ là đạt. Nếu làm tiêu bản quá dày sẽ khó soi, làm mỏng quá sẽ bỏ sót trứng giun sán.

183. Trứng giun soi tập trung

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện trứng giun đũa, tóc, móc trong phân.

2. Nguyên lý

Nước muối bão hòa có tỷ trọng lớn hơn tỷ trọng của trứng giun đũa, tóc, móc vì vậy sẽ làm cho trứng giun nổi lên trên bề mặt của dung dịch và bám vào bề mặt của lá kính.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Đồng hồ bấm giờ

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	1,000
4	Lá kính	Cái	1,000
5	Bông	Kg	0,001
6	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
7	Panh	Cái	0,0001
8	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
9	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Nước muối bão hòa	ml	15,000
11	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
12	Pipet nhựa	Cái	2,000
13	Axit ngậm lam	ml	10,000
14	Mũ	Cái	0,020

15	Khẩu trang	Cái	0,020
16	Găng tay	Đôi	3,000
17	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
18	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
19	Bút viết kính	Cái	0,020
20	Bút bi	Cái	0,010
21	Bật lửa	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
27	QC (nếu thực hiện) *		0,1
28	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Phân

3. 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 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Cho nước muối bão hòa vào lọ đựng bệnh phẩm (1/3 lọ), dùng que đánh tan bệnh phẩm.

2.2. Nhỏ nước muối bão hòa vào gần đầy lọ gọt bỏ bệnh phẩm nổi trên bề mặt sau đó nhỏ tiếp dung dịch vào đầy miệng lọ.

2.3. Đậy lá kính lên trên lọ bệnh phẩm để thời gian 15 phút.

2.4. Nhấc lá kính đặt trên lam kính.

2.5. Quan sát kính hiển vi ở vật kính 10X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

Quan sát tất cả các vi trường ở vật kính 10X tìm trứng giun, chọn vi trường có số trứng giun cao nhất để đánh giá kết quả:

- Trứng giun dũa hình tròn hoặc bầu dục kích thước 35-50 x 45-75 μ m, ngoài cùng là lớp Albumin xù xì bắt màu vàng, vỏ dày, trong là khối nhân sẫm màu. Ngoài ra có thể còn gặp trứng giun dũa mất tầng Albumin.
- Trứng giun móc hình bầu dục kích thước 40-60 μ m màu trong vỏ mỏng, trong là khối nhân phân chia từ 2-4 .
- Trứng giun tóc hình bầu dục, kích thước 22-50 μ m giống hình quả cau, màu vàng vỏ dày, 2 cực có 2 nắp.

Ghi tên trứng giun và mức độ nhiễm:

- 1 trứng giun / vi trường : (+)
- 2 - 5 trứng giun / vi trường : (++)
- 6 - 20 trứng giun / vi trường : (+++)
- > 20 trứng giun / vi trường : (++++)

2. Âm tính

Không thấy trứng giun

Lưu ý

Trong trường hợp xét nghiệm lần đầu âm tính, để phát hiện KST gây bệnh có thể xét nghiệm 2 mẫu phân tiếp theo trong vòng từ 7-10 ngày.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Không gạt bỏ bệnh phẩm nổi trên miệng lọ, kết quả có thể bị sai.
- Để thời gian quá ngắn trứng giun chưa kịp nổi trên bề mặt dung dịch.

2. Xử trí

- Gạt bỏ sạch bệnh phẩm nổi trên mặt dung dịch.
- Để đủ thời gian quy định.

184. *Strongyloides stercoralis* (Giun lươn) ấu trùng soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện ấu trùng *S. stercoralis* trong phân.

2. Nguyên lý

Ấu trùng *S. stercoralis* được phát hiện dựa vào hình thể, kích thước và chuyển động khi soi tươi phân.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	1,000
4	Lá kính	Cái	1,000
5	Bông	Kg	0,001
6	Cồn 90 ⁰ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
7	Panh	Cái	0,0001
8	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
9	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Nước muối sinh lý	ml	5,000
11	Pipet nhựa	Cái	2,000
12	Axit ngậm lam	ml	10,000
13	Mũ	Cái	0,020
14	Khẩu trang	Cái	0,020
15	Găng tay	Đôi	3,000

16	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
17	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
18	Bút viết kính	Cái	0,020
19	Bút bi	Cái	0,010
20	Bật lửa	Cái	0,010
21	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
22	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
23	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
24	Khăn lau tay	Cái	0,010
25	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
26	QC (nếu thực hiện) *		0,1
27	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Phân

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Dùng que sạch lấy phân ở nhiều vị trí, cho vào lọ sạch có dán nhãn ghi đủ các thông tin tên, tuổi người bệnh, khoa phòng gửi xét nghiệm, ngày giờ lấy bệnh phẩm.

Thời gian để mẫu làm xét nghiệm không quá 1 giờ.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nhỏ dung dịch NaCL 9 % lên lam kính.

2.2. Dùng que lấy bệnh phẩm hòa lên trên dung dịch NaCL 9 % đến khi đục.

2.3. Đặt lá kính lên trên giọt dung dịch.

2.4. Quan sát kính hiển vi ở vật kính 10X- 40X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

- Ấu trùng giun lươn có kích thước 16 x 220 μ m, chuyển động.

- Phân biệt ấu trùng giun lươn và ấu trùng giun móc, mỏ: hình thể 2 loại ấu trùng khó có thể phân biệt, nhưng ấu trùng giun lươn xuất hiện ngay sau khi phân mới bài xuất còn ấu trùng giun móc, mỏ xuất hiện muộn (18- 24 giờ).

2. Âm tính

Không thấy ấu trùng giun lươn.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Nhỏ quá nhiều dung dịch lên lam kính.
- Làm tiêu bản quá dày hoặc quá mỏng.

2. Xử trí

Nhỏ dung dịch vừa phải.

185. *Angiostrongylus cantonensis* (Giun tròn chuột) Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Angiostrongylus cantonensis* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Angiostrongylus cantonensis* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2-8°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	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 côn 10 ml	Cái	1,000
17	Đầu côn 200 ml	Cái	4,000
18	Đầu côn 1000 ml	Cái	1,000
19	Pipet nhựa	Cái	1,000
20	Sinh phẩm chẩn đoán (QC)	Test	0,400
21	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
22	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.

3. 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 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

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 vào mỗi giếng.

2.3. Ủ ở nhiệt độ 15-25°C.

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.

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.

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 vỗ nhẹ thanh nhựa vào giấy thấm cho ráo nước và làm tiếp các bước tiếp theo ngay không để các giếng bị khô.

186. *Clonorchis/Opisthorchis* (Sán lá gan nhỏ) Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu với sán lá gan nhỏ có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu với sán lá gan nhỏ dựa trên nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2 – 8⁰ C
- Hệ thống máy ELISA
- Micropipette các loại
- Máy in
- Đồng hồ bấm giây
- Máy ly tâm thường

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	Ống lấy bệnh phẩm	Ống	1,000
2	Bơm tiêm	Cái	1,000
3	Bông	Kg	0,001
4	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	Ml	10,000
5	Panh	Cái	0,0001
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Hóa chất chính	Test	1,000

9	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng (QC)	Test	0,500
10	Đầu côn xanh	Cái	2,000
11	Đầu côn vàng	Cái	3,000
12	Axit ngấm rửa	ML	10,000
13	Nước cất	ML	250,000
14	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	2,000
15	Mũ	Cái	0,020
16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	2,000
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ML	1,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ML	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
27	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

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 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Lấy bộ kit ra khỏi tủ lạnh, lấy đủ số giếng cần làm.

2.2. Chuẩn bị hóa chất: pha dung dịch rửa, chứng âm, chứng dương...

2.3. Nhỏ mẫu, chứng theo sơ đồ vào các giếng

2.4. Ủ mẫu

2.5. Rửa giếng, thêm cộng hợp, ủ mẫu

2.6. Rửa giếng, thêm cơ chất, ủ tránh sáng

2.7. Thêm chất dừng phản ứng, đọc kết quả bằng máy đo quang

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Kết quả được chấp nhận khi giá trị OD của các giếng chứng đạt đủ điều kiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Tính C.O theo hướng dẫn của nhà sản xuất
 - + Dương tính khi: $OD_{mẫu} \geq C.O$
 - + Âm tính khi: $OD_{mẫu} < C.O$

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

- Chứng âm và những mẫu bệnh phẩm âm tính bị nhiễm chéo bởi huyết thanh/huyết tương có nồng độ kháng thể cao.
- Hóa chất bị nhiễm bẩn, nhiễm các tác nhân oxid hóa.
- Đọc kết quả quá thời gian qui định sau khi dừng phản ứng.

2. Xử trí

- Tuân thủ đúng các bước quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn về độ ổn định hóa chất xét nghiệm trong bộ sinh phẩm sử dụng.
- Kiểm tra và vệ sinh máy rửa thường xuyên trước và sau khi làm xét nghiệm.
- Chia hóa chất (chất cộng hợp, dung dịch hiện màu và dừng phản ứng) vào ống nghiệm sạch trước mỗi lần nhỏ.
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất

187. *Cysticercus cellulosae* (Sán lợn)

Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Cysticercus cellulosae* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Cysticercus cellulosae* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2 - 8°C
- Micropipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl.
- Giá đựng ống máu
- Ống nghiệm.
- Ống đong chia vạch.
- Giấy thấm.

2.1. 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 côn 10 ml	Cái	1,000
17	Đầu côn 200 ml	Cái	4,000
18	Đầu côn 1000 ml	Cái	1,000
19	Pipet nhựa	Cái	1,000
20	Sinh phẩm chẩn đoán (kiểm chuẩn)	Test	0,400
21	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
22	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

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 4).

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

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.

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.

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 vỗ nhẹ thanh nhựa vào giấy thấm cho ráo nước và làm tiếp các bước tiếp theo ngay không để các giếng bị khô.

88. *Entamoeba histolytica* (Amip)

Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH, NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Entamoeba histolytica* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Entamoeba histolytica* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2- 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	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 chẩn đoán (QC)	Test	0,400
21	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
22	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

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 4).

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

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.

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.

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 vỗ nhẹ thanh nhựa vào giấy thấm cho ráo nước và làm tiếp các bước tiếp theo ngay không để các giếng bị khô.

189. *Fasciola* (Sán lá gan lớn) Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Fasciola* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng *Fasciola* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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 an toàn sinh học cấp 2
- Tủ lạnh 2- 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	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 côn 10 ml	Cái	1,000
17	Đầu côn 200 ml	Cái	4,000
18	Đầu côn 1000 ml	Cái	1,000
19	Pipet nhựa	Cái	1,000
20	Sinh phẩm chẩn đoán(QC)	Test	0,400
21	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
22	QC (nếu thực hiện) *		0,1
23	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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).

1 - 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

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 4).

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 1/100 vào mỗi giếng.

2.3. Ủ ở nhiệt độ 15-25°C.

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.
- 2.6. Rửa với dung dịch rửa đã pha loãng, lắc sạch nước.
- 2.7. Nhỏ Chromogen vào mỗi giếng ủ ở nhiệt độ phòng.
- 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 vỗ nhẹ thanh nhựa vào giấy thấm cho ráo nước và làm tiếp các bước tiếp theo ngay không để các giếng bị khô.

190. *Filaria* (Giun chỉ) ấu trùng trong máu nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện ấu trùng giun chỉ trong máu.

2. Nguyên lý

Nhận định ấu trùng giun chỉ trong máu trên tiêu bản nhuộm Giemsa dựa trên hình thể, cấu tạo, kích thước và tính chất bắt màu.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Đồng hồ bấm giờ

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	Tube lấy bệnh phẩm	Cái	1,000
2	Que cấy	Cái	1,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Lá kính	Cái	2,000
5	Giemsa cốt	ml	1,000
6	Dung dịch đệm	ml	10,000
7	Bông	Kg	0,001
8	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
9	Panh	Cái	0,0001
10	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
11	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
12	Pipet nhựa	Cái	2,000
13	Axit ngậm lam	ml	10,000
14	Mũ	Cái	0,100
15	Khẩu trang	Cái	0,100

16	Găng tay	Đôi	3,000
17	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
18	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
19	Dung dịch rửa tay	ml	8,000
20	Khăn lau tay	Cái	0,010
21	Bút viết kính	Cái	0,020
22	Bút bi	Cái	0,010
23	Bật lửa	Cái	0,010
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
25	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
27	QC (nếu thực hiện) *		0,1
28	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Máu toàn phần có chống đông.

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

+ Thời gian lấy máu

Lấy máu về đêm từ 22 giờ đêm đến 4 giờ sáng.

+ Cách lấy máu

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem Phụ lục 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Làm 3 giọt máu đặc trên cùng 1 lam để khô.

2.2 Pha dung dịch Giemsa cốt với dung dịch đệm nồng độ 10%.

2.3. Nhuộm lam với dung dịch Giemsa đã pha để 10 phút.

2.4. Rửa nước, để khô.

2.5. Quan sát kính hiển vi vật kính 10X- 40X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

Ấu trùng giun chỉ có kích thước 180 - 220 X 5 - 6µm bắt màu xanh tím. Ngoài cùng là lớp áo dài hơn thân, trên thân có các hạt nhiễm sắc.

2. Âm tính

Không tìm thấy ấu trùng giun chỉ.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

2. Xử trí

Lấy máu vừa phải, rửa dưới vòi nước chảy nhẹ hoặc đưa vào trong chậu rửa.

191. *Gnathostoma*(Giun đầu gai) Ab

Miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Gnathostoma* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Gnathostoma* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2-8°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	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 côn 10 ml	Cái	1,000
17	Đầu côn 200 ml	Cái	4,000
18	Đầu côn 1000 ml	Cái	1,000
19	Pipet nhựa	Cái	1,000
20	Sinh phẩm chuẩn đoán	Test	1,000
21	QC (nếu thực hiện) *		0,1
22	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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 thanh

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 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

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 vào mỗi giếng.

2.3. Ủ ở nhiệt độ 15-25°C.

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.

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.

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 vỗ nhẹ thanh nhựa vào giấy thấm cho ráo nước và làm tiếp các bước tiếp theo ngay không để các giếng bị khô.

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

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện ký sinh trùng sốt rét trong máu.

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Đồng hồ bấm giờ

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	Tube lấy bệnh phẩm	Cái	1,000
2	Que cấy	Cái	1,000
4	Lam kính	Cái	2,000
5	Giemsa cốt	ml	1,000
6	Dung dịch đệm	ml	10,000
7	Bông	Kg	0,001
8	Cồn 96 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
9	Panh	Cái	0,0001
10	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
11	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
12	Pipet nhựa	Cái	2,000
13	Axit ngậm lam	ml	10,000
14	Mũ	Cái	0,100
15	Khẩu trang	Cái	0,100

16	Găng tay	Đôi	3,000
17	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
18	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
19	Dung dịch rửa tay	ml	8,000
20	Khăn lau tay	Cái	0,010
21	Bút viết kính	Cái	0,020
22	Bút bi	Cái	0,010
23	Bật lửa	Cái	0,010
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
25	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
26	Đũa thủy tinh	Cái	1,000
27	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
28	QC (nếu thực hiện) *		0,1
29	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Máu toàn phần có chống đông.

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 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Làm tiêu tiêu bản giọt máu đặc và giọt máu đàn để khô.

2.2. Cố định giọt máu đàn bằng cồn 96°.

2.3. Pha dung dịch Giemsa cốt với dung dịch đệm nồng độ 10%.

2.4. Nhuộm lam với dung dịch Giemsa đã pha để 10 phút.

2.5. Rửa nước, để khô.

2.6. Quan sát kính hiển vi vật kính 100X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

- Có 4 loài ký sinh trùng sốt rét gây bệnh cho người

Plasmodium falciparum, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*.

- Các thể gặp khi xét nghiệm máu
- *Plasmodium falciparum*: Thể tư dưỡng, thể giao bào ở máu ngoại vi, hiếm gặp thể phân liệt.
- *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*: Cả 3 thể: thể tư dưỡng, thể phân liệt, thể giao bào ở máu ngoại vi.

Đánh giá mức độ nhiễm KSTSR ở giọt máu đặc theo 4 mức độ

- 1 - 10 KST / 100 vi trường: (+).
- 11 - 100 KST / 100 vi trường: (++)
- 1 - 10 KST / 1 vi trường: (+++).
- > 10 KST / 1 vi trường: (++++).

2. Âm tính

Không tìm thấy ký sinh trùng sốt rét.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

2. Xử trí

Lấy máu vừa phải, rửa dưới vòi nước chảy nhẹ hoặc đưa vào trong chậu rửa.

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

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét có trong 1mm³ máu trên tiêu bản nhuộm Giemsa.

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Đồng hồ bấm giờ.
- Hai máy đếm.

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	Tube lấy bệnh phẩm	Cái	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Que thủy tinh	Cái	1,000
4	Giemsa cốt	ml	1,000
5	Dung dịch đệm	ml	10,000
6	Bông	Kg	0,001
7	Cồn 96 độ	ml	10,000
8	Panh	Cái	0,0001
9	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
11	Pipet nhựa	Cái	2,000
12	Axit ngâm lam	ml	10,000

13	Mũ	Cái	0,100
14	Khẩu trang	Cái	0,100
15	Găng tay	Đôi	3,000
16	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
17	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
18	Dung dịch rửa tay	ml	8,000
19	Khăn lau tay	Cái	0,010
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Bật lửa	Cái	0,010
23	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
24	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
25	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
26	QC (nếu thực hiện) *		0,1
27	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Máu toàn phần có chứa chống đông.

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 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Làm tiêu bản giọt máu đặc và giọt máu dàn trên cùng 1 lam để khô.

2.2. Cố định giọt máu dàn bằng cồn 96°, để khô.

2.3. Pha dung dịch Giemsa cốt với dung dịch đệm nồng độ 10%.

2.4. Nhuộm dung dịch Giemsa 10% để 10 phút, rửa nước, để khô.

2.5. Quan sát kính hiển vi vật kính 100X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Xác định số lượng ký sinh trùng sốt rét trên 1mm^3 máu theo bạch cầu (Dựa vào số lượng bạch cầu chuẩn 8.000 BC).
- Nếu đếm được 200 BC, số lượng KSTSR > 10 , áp dụng công thức

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

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

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

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

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

2. Xử trí

Lấy máu vừa phải, rửa dưới vòi nước chảy nhẹ hoặc đưa vào trong chậu rửa.

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

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

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

2. Nguyên lý

Kháng thể kháng ký sinh trùng sốt rét sẽ gắn đặc hiệu với kháng nguyên (ký sinh trùng sốt rét) có trong bệnh phẩm máu. Phản ứng xảy ra theo nguyên lý sắc ký miễn dịch.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Micropipette.
- Đồng hồ bấm giờ.

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	Tube lấy bệnh phẩm	Cái	1,000
2	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
3	Bông	Kg	0,001
4	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
5	Panh	Cái	0,0001
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Pipet nhựa	Cái	2,000
9	Mũ	Cái	0,100
10	Khẩu trang	Cái	0,100
11	Găng tay	Đôi	3,000
12	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
13	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
14	Dung dịch rửa tay	ml	8,000
15	Khăn lau tay	Cái	0,010
16	Bút viết kính	Cái	0,020

17	Bút bi	Cái	0,010
18	Bật lửa	Cái	0,010
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
20	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
21	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Máu toàn phần có chống đông.

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 4).

2. Tiến hành kỹ thuật

Sinh phẩm chẩn đoán của SD BIOLINE

2.1. Lấy thanh thử ra khỏi bao, để trên mặt phẳng khô sạch.

2.2. Lấy 5µl máu đầu ngón tay bằng ống hút đến ngang vạch có sẵn hoặc máu tĩnh mạch cho vào giếng tròn S.

2.3. Nhỏ 4 giọt buffer vào giếng vuông bên cạnh.

2.4. Đọc kết quả sau 15 -30 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Âm tính

Chỉ có vạch C.

2. Dương tính

- *P. falciparum* dương tính: có 2 vạch C và *P.f*
- *P. vivax* dương tính: có 2 vạch C và *P.v*
- Nhiễm phối hợp cả *P. falciparum* và *P.vivax*: có 3 vạch : vạch C, *P. f* và *P.v*

3. 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

Không đọc kết quả quá 30 phút vì có thể dẫn đến kết quả sai.

195. *Strongyloides stercoralis* (Giun lươn) Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Strongyloides stercoralis* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Strongyloides stercoralis* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2-8°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	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 chẩn đoán (QC)	Test	0,400
21	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
22	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

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 4).

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.

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.

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.

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 vỗ nhẹ thanh nhựa vào giấy thấm cho ráo nước và làm tiếp các bước tiếp theo ngay không để các giếng bị khô.

196. *Toxocara* (Giun đũa chó mèo) Ab miễn dịch bán tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Toxocara* có trong mẫu huyết thanh.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng với *Toxocara* có trong mẫu huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2-8°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	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 chẩn đoán (QC)	Test	0,400
21	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
22	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

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 4).

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 vố nhẹ thanh nhựa vào giấy thấm cho ráo nước và làm tiếp các bước tiếp theo ngay không để các giếng bị khô.

197. *Toxoplasma* IgM miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgM kháng toxoplasma virus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgM kháng toxoplasma virus dựa trên nguyên lý của kỹ CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Hệ thống máy Cobas e 6000
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C) hoặc (- 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette thể tích từ 50 µl đến 200 µl..

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	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	Test	0,001

8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	2,000
12	Control	Test	0,100
13	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,150
14	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,150
15	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
16	Cleancell M	ml	3,000
17	Procell M	ml	3,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	chiếc	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	ml	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	chiếc	5,000
23	Sample cup	Cái	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm Toxo IgM Elecsys Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định lượng Toxo IgM
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests.
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng.
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm
4	Chọn tên test là Toxo IgM
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

3. Kết quả và báo cáo

- Âm tính: Nếu $COI < 0,8$.
- Không xác định: Nếu $0,8 \leq COI < 1$.
- Dương tính: Nếu $COI \geq 1$.

Những mẫu không xác định cần kiểm tra lại lần 2. Nếu vẫn lặp lại kết quả lần đầu thì nên xét nghiệm lại với mẫu bệnh phẩm thứ hai sau 2 – 3 tuần.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ)→ Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).

198. *Toxoplasma* IgG miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện kháng thể IgG kháng toxoplasma virus trong huyết thanh hoặc huyết tương.

2. Nguyên lý

Phát hiện kháng thể IgG kháng toxoplasma virus dựa trên nguyên lý của kỹ CLIA (miễn dịch điện hóa phát quang) (VD).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Hệ thống máy Cobas e 6000
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Bộ lưu điện
- Máy ly tâm
- Tủ lạnh 2⁰C - 8⁰C
- Tủ âm sâu (- 20⁰C) hoặc (- 70⁰C) (nếu có)
- Micropipette thể tích từ 50 µl đến 200 µl..

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

Thực hiện xét nghiệm 01 mẫu/lần.

STT	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	Test	0,001

8	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng	Test	2,000
12	Control	Test	0,100
13	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,150
14	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,150
15	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020
16	Cleancell M	ml	3,000
17	Procell M	ml	3,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	chiếc	2,000
20	Assay Tip/Cup E170	ml	3,000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0,500
22	Nước cất	chiếc	5,000
23	Sample cup	Cái	1,000
24	Giấy thấm	Cuộn	0,100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
27	Bút viết kính	Cái	0,020
28	Bút bi	Cái	0,010
29	Mũ	Cái	0,020
30	Khẩu trang	Cái	0,020
31	Găng tay	Đôi	0,100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
33	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
34	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
35	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
36	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
37	Khăn lau tay	Cái	0,010

* 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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 6.

2. Tiến hành kỹ thuật: Bộ sinh phẩm Toxo IgG Elecsys Roche (VD)

Các bước	Xét nghiệm định lượng Toxo IgG
1	Vào Reagent để kiểm tra số lượng tests.
2	Vào Calibration → Status để kiểm tra hiệu chuẩn
3	Chạy chứng
Chạy mẫu không dùng barcode	
1	Đánh số sample cup theo mã số bệnh phẩm. Hút huyết thanh/huyết tương vào sample cup tương ứng.
2	Vào màn hình Workplace → Test Selection
3	Nhập mã bệnh phẩm
4	Chọn tên test là Toxo IgG
5	Vào Barcode Read Error
6	Nhập số rack và vị trí mẫu → Add → OK → Save
7	Đặt mẫu đã được hút vào Sample Cup lên Rack màu xám đúng vị trí đã order rồi đưa vào khu nạp giá mẫu.
8	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions
Chạy mẫu có barcode	
1	Nhập chỉ định xét nghiệm trên máy tính bằng phần mềm LIS
2	Đặt ống máu đã được dán barcode vào rack màu xám, quay mặt barcode ra phía ngoài rồi đưa vào khu nạp giá mẫu
3	Chọn Start → Chọn START ở màn hình Start Conditions

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

- Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.
- Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

2. Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm:

Chứng nội kiểm, ngoại kiểm: Đánh giá kết quả dựa trên biểu đồ Levey-Jenning (nếu có)

3. Kết quả và báo cáo

- Âm tính: Nếu $COI < 1 \text{ IU/ml}$
- Không xác định: Nếu $1 \leq COI < 30 \text{ IU/ml}$
- Dương tính: Nếu $COI \geq 30 \text{ IU/ml}$

Những mẫu không xác định cần kiểm tra lại lần 2. Nếu vẫn lặp lại kết quả lần đầu thì nên xét nghiệm lại với mẫu bệnh phẩm thứ hai sau 2 – 3 tuần.

* Ngưỡng phát hiện và dải định lượng:

- Ngưỡng phát hiện: 0,13 IU/ml
- Dải định lượng: 0,13 – 650 IU/ml

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Máy báo sample short (do bệnh phẩm bị đông hoặc không đủ)→ Chú ý ly tâm mẫu thật kỹ ngay từ đầu hoặc hút mẫu ra cup.
- Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng.
- Tránh tạo bọt ở lọ thuốc thử và các loại mẫu (bệnh phẩm, calibration và chứng).

199. *Toxoplasma* Avidity miễn dịch tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

Xác định ái tính của các kháng thể IgG kháng *T. gondii* trong huyết thanh và huyết tương người dựa trên nguyên lý của kỹ thuật ECLIA (miễn dịch điện hóa phát quang (VD)).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

2. Phương tiện, hóa chất

2.1. Trang thiết bị

- Hệ thống máy miễn dịch tự động.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm thường.
- Tủ âm 20⁰C (nếu có).
- Tủ lạnh 4⁰C -8⁰C
- Pipet vi lượng thể tích 50 µl - 200 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	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	1,000
9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chuẩn	Test	0,100
11	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra lại	Test	0,150
12	Chứng ngoại kiểm âm (nếu có)	ml	0,010
13	Chứng ngoại kiểm dương (nếu có)	ml	0,010
14	Chứng nội kiểm	Test	0,100
15	Ngoại kiểm (nếu có)*		0,020

16	Cleancell M	ml	3,000
17	Procell M	ml	3,000
18	Probe Wash M	ml	2,000
19	Preclean M	ml	2.000
20	Assay Tip/Cup E170	Chiếc	3.000
21	ISE Cleaning Solution F. HIT	ml	0.500
22	Nước cất	ml	5.000
23	Sample cup	Cái	1.000
24	Giấy thấm	Cuộn	0.100
25	Giấy xét nghiệm	Tờ	2.000
26	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0.001
27	Bút viết kính	Cái	0.020
28	Bút bi	Cái	0.010
29	Mũ	Cái	0.020
30	Khẩu trang	Cái	0.020
31	Găng tay	Đôi	0.100
32	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0.020

* 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 của người bệnh

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC THỰC HIỆN

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 chi tiết phụ lục 2.
- Từ chối những bệnh phẩm không đạt yêu cầu: xem chi tiết phụ lục 4.

2. Tiến hành kỹ thuật

Bộ sinh phẩm Elecsys Toxo IgG Avidity (Roche) (VD)

Các bước	Xét nghiệm xác định Toxo IgG Avidity
1	Đề số lượng sinh phẩm cần dùng ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm.
2	Đề tối ưu hiệu năng XN nên tuân theo tờ hướng dẫn kèm theo bộ thuốc thử.
3	Tham khảo hướng dẫn vận hành cho từng XN đặc hiệu tương ứng.
4	Thiết bị tự động trộn các vi hạt trước khi sử dụng.
5	Máy đọc thông số đặc hiệu của XN trên mã vạch của thuốc thử,

	trong trường hợp ngoại lệ nếu máy không đọc được mã vạch hãy nhập chuỗi 15 con số vào.
6	Thuốc thử dạng pha sẵn để sử dụng và được đựng trong lọ tương thích với hệ thống
7	Đưa thuốc thử đang lạnh về nhiệt độ 20 ⁰ C và đặt vào khay thuốc thử trên máy phân tích, tránh tạo bọt, hệ thống sẽ tự động điều hòa nhiệt độ của thuốc thử và tự động đóng/mở nắp chai.
8	Đặt mẫu chuẩn hoàn nguyên lên vùng đặt mẫu, máy phân tích tự động ghi nhận tất cả thông tin cần thiết cho việc chuẩn XN, sau khi hoàn thành chuẩn, lưu trữ cal1 và cal2 ở 2 ⁰ C -8 ⁰ C hoặc loại bỏ chúng.
9	Chạy các mẫu chứng với nồng độ khác nhau tối thiểu 1 lần cho mỗi 24 giờ khi XN vẫn đang sử dụng, một lần với mỗi hộp thuốc thử và sau mỗi lần chuẩn, kết quả mẫu chứng phải nằm trong thang.
10	Trước khi đo ái tính, nồng độ mẫu phải được xác định bằng XN Toxo IgG (REF 04618815190)
11	Các mẫu phản ứng khi sử dụng XN Elecsys Toxo IgG có nồng độ 6-500 IU/mL được tách vào 2 aliquot
12	Nếu mẫu phản ứng khi sử dụng XN Elecsys Toxo IgG có nồng độ > 500 IU/mL thì mẫu phải được pha loãng thủ công bằng Diluent Universal trước khi tách vào 2 aliquot.
13	Kiểm tra chất lượng: sử dụng Elecsys Precicontrol Toxo IgG Avidity, chạy các mẫu chứng với nồng độ khác nhau ít nhất 1 lần cho mỗi 24 giờ khi XN vẫn đang sử dụng và sau mỗi lần chuẩn định.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tính toán

- Máy phân tích tự động tính toán nồng độ chất phân tích trong mỗi mẫu đo dưới dạng U/ml

- Ái tính (Avi%) được tính toán theo công thức:

$$Avi\% = 100 - [(IU/ml \text{ của aliquot xử lý với DilToxoAv} / IU/ml \text{ của aliquot xử lý với DilUni} \times 100\%]$$

Chú ý:

+ Nếu mẫu pha loãng bằng DilUni có nồng độ < 3 IU/mL (kết quả không xác định) thì không thể tính toán ái tính.

+ Nếu mẫu pha loãng bằng DilToxoAv có nồng độ < 0.130 IU/mL (< giới hạn phát hiện thấp hơn) thì không thể tính toán ái tính.

2. Diễn giải kết quả

Kết quả thu được với XN Elecsys Toxo IgG Avidity được diễn giải như sau:

Ái tính	Diễn giải kết quả
< 70	Ái tính thấp
70 – 79	Vùng xám
≥ 80	Ái tính cao

- Nếu kết quả vùng xám, khuyến cáo lấy lại mẫu trong khoảng thời gian thích hợp (khoảng 2-4 tuần sau) → làm lại xét nghiệm.

Các kết quả Elecsys Toxo IgG Avidity nên được sử dụng kết hợp với bệnh sử, thăm khám lâm sàng và các kết quả XN khác như Toxo IgG, Toxo IgM đặc hiệu.

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).
- Các kết quả trên người bệnh HIV, người bệnh đang tham gia liệu pháp ức chế miễn dịch hay trên những người bệnh có các rối loạn khác dẫn đến ức chế miễn dịch thì nên thận trọng khi diễn giải kết quả
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

200. *Demodex* soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện hình thái các loài *Demodex* gây bệnh ngoài da.

2. Nguyên lý

Dưới tác dụng của KOH 10% biểu mô sừng mềm và mỏng do đó bộc lộ hình thái *Demodex*.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- 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	Số lượng
1	Lá kính	Cái	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Lam kính (QC)	Cái	0,200
4	Dầu thực vật	Ml	1,000
5	Mỏ vít	Cái	2,000
6	Bông	Kg	0,001
7	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	Ml	10,000
8	KOH 10%	Cái	1,000
9	Đèn cồn	Cái	0,0001
10	Panh	Cái	0,0001
11	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
12	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
13	Mũ	Cái	0,020
14	Khẩu trang	Cái	0,020
15	Găng tay	Đôi	3,000
16	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020

17	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
18	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
19	Bút viết kính	Cái	0,020
20	Bút bi	Cái	0,010
21	Bật lửa	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,030
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

QC ký sinh trùng *Demodex*: Có bộ tiêu bản mẫu

3. Bệnh phẩm

Bệnh phẩm vảy da, chất bã nhờn

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

- Dùng dao cùn đặt vuông góc với bề mặt da và song song với lam kính, sau đó cạo vảy da ở vị trí được chỉ định
- Cạo sâu hơn cạo nấm da
- Vị trí thường lấy: Mặt, đầu, lưng, ngực

2. Tiến hành kỹ thuật

Tập trung bệnh phẩm lên lam kính

- Nhỏ KOH 10%, đậy lamén, ấn nhẹ để bệnh phẩm ngấm hoá chất và dàn đều.
- Nếu bệnh phẩm là chất bã hòa tan vào 1-2 giọt dầu thực vật. Đọc sau vài phút.
- Thời gian thực hiện: 5- 7 phút và đọc kết quả sau 1-2giờ.

IV. Nhận định kết quả

- Quan sát đặc điểm hình thể của *Demodex*
- Đối với *Demodex* trưởng thành, cơ thể chia làm 3 phần rõ: Đầu, ngực, đuôi. Chúng chỉ khác nhau ở phần đuôi (*D. folliculorum* đuôi dài, *D. brevis* đuôi ngắn). Còn phần đầu và ngực tương tự nhau
- Đánh giá độ tập trung của *Demodex*:

+ Nếu độ tập trung của Demodex $>$ hoặc $= 5$ con/ vi trường ở độ phóng đại thấp (100): Demodex là tác nhân gây bệnh.

+ Nếu độ tập trung của Demodex < 5 / vi trường ở độ phóng đại thấp (100) thì Demodex chưa hẳn là tác nhân gây bệnh.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Lấy bệnh phẩm tại thương tổn không điển hình
- Bệnh phẩm lẫn nhiều chất bã và vảy da
- Bệnh phẩm quá dày hoặc quá mỏng
- Không lấy được bệnh phẩm ở sâu
- Người bệnh bôi thuốc diệt ký sinh trùng

2. Xử trí

- Chọn thương tổn điển hình (như mô tả)
- Dùng ngón trỏ dàn mỏng bệnh phẩm
- Cạo sâu hơn cạo nắm một chút
- Người bệnh không bôi thuốc diệt ký sinh trùng trước đó 3-5 ngày.

201. *Demodex* nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện hình thái các loài *Demodex* gây bệnh ngoài da

2. Nguyên lý

Hình thái *Demodex* được quan sát rõ khi bệnh phẩm được hòa tan trong dầu thực vật.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Bàn lấy bệnh phẩm
- Hộp đựng dao cùn đã tiệt trùng
- Giá đựng lam

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	Dao cùn đã tiệt trùng	Cái	1,000
2	Dầu thực vật (Oliu, đậu nành)	ml	2,000
3	Lam kính, lá kính	Cái	1,000
4	Găng tay	Đôi	1,000
5	Bút viết kính	Cái	1,000

QC ký sinh trùng *Demodex*: Có bộ tiêu bản mẫu.

3. Bệnh phẩm: Chất bã

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

- Vị trí vùng mặt: Mũi, rãnh mũi má, giữa hai cung mày, cằm
- Ngoài ra, còn lấy ở vị trí khác:
 - + Lưng
 - + Ngực...

2. Các bước thực hiện

- 2.1. Dùng hai ngón trỏ và ngón cái nặn chất bã.
- 2.2. Dùng dao cùn gạt lượng chất bã vừa nặn trên bề mặt da
- 2.3. Tập trung bệnh phẩm lên lam kính
- 2.4. Nhỏ dầu thực vật 10%,
- 2.5. Hòa chất bã vào giọt dầu thực vật đến khi tan hoàn toàn
- 2.6. Đậy lamén, ấn nhẹ để bệnh phẩm ngấm hoá chất và dàn đều.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Dùng vật kính 10X quan sát sơ bộ hình thể, đếm số lượng và độ tập trung của Demodex. Còn vật kính 20X, 40X nhận định rõ hình thể, cấu tạo của từng loại và từng giai đoạn Demodex.

- Quan sát kỹ đặc điểm hình thể của Demodex trưởng thành
Đối với Demodex trưởng thành, cơ thể chia làm 3 phần rõ rệt:
 - + Đầu: Có 1 đôi râu, ở giữa là cái mỏ nhọn, có thể chuyển động được.
 - + Ngực: Bốn đôi chân ngắn đối xứng nhau, chuyển động nhiều.
 - + Đuôi: Dạng hình ống giống như giun, bên trong chứa đầy hạt và không bào. Có thể chuyển động nhưng ít hơn so với chân.
- Có hai loài Demodex nhưng về hình thái chúng chỉ khác nhau ở phần đuôi (*D. folliculorum* đuôi dài, *D. brevis* đuôi ngắn). Còn phần đầu và ngực tương tự nhau
 - Chiều dài của Demodex
 - + *D. folliculorum*: Con đực 0,219mm, con cái 0,294mm.
 - + *D. brevis*: Con đực 0,165mm, con cái 0,208mm.
 - Đánh giá độ tập trung của Demodex
 - + Nếu độ tập trung của Demodex > hoặc = 5 con/ vi trường ở độ phóng đại thấp (100): Demodex là tác nhân gây bệnh.

+ Nếu độ tập trung của Demodex < 5/ vi trường ở độ phóng đại thấp (100) thì Demodex chưa hẳn là tác nhân gây bệnh.

- Bên cạnh đó, trên tiêu bản dầu thực vật có thể quan sát được sự chuyển động của Demodex rất sinh động

V. NHỮNG SAI XÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Nặn quá nhiều chất bã và nhỏ ít dầu thực vật
- Hòa bệnh phẩm chưa tan hoàn toàn

2. Xử trí

- Nặn chất bã vừa phải tương ứng với lượng dầu thực vật để chất bã tan hoàn toàn trong dầu thực vật.
- Dùng ngón tay dàn mỏng bệnh phẩm.

202. *Phthirus pubis* (Rận mu) soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện hình thái *Phthirus pubis* gây bệnh ngoài da

2. Nguyên lý

Dưới tác dụng của KOH 10% biểu mô sừng mềm và mỏng do đó bộc lộ hình thái *Phthirus pubis*.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

Bàn lấy bệnh phẩm

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	Lược mau	Cái	1,000
2	Giấy trắng	Tờ	1,000
3	Găng tay	Đôi	1,000
4	Kính núp	Cái	1,000

3. Bệnh phẩm

Vẩy da, sợi lông mu

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

- Dùng kính lúp soi vùng lông và da mu
- Chú ý vùng chân lông tìm rận mu
- Ở thân lông có thể tìm thấy trứng rận

2. Các bước tiến hành

2.1. Dùng lược mau chải từ chân lông ra ngọn một cách nhẹ nhàng .

2.2. Đặt tờ giấy trắng vuông góc vùng da mu và song song với lược mau.

2.3. Dùng kính lúp soi vào tờ giấy trắng tìm rận hoặc có thể soi vào vùng da mu và thân lông tìm ấu trùng, trứng rận.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Rận mu:

+ Cơ thể chia làm 3 phần rõ rệt: Đầu có vòi, ăng ten, mắt đơn, ngực có 3 đốt, bụng có 9 đốt.

+ Rận trưởng thành có 3 cặp chân, ấu trùng có 4 cặp chân đối xứng nhau.

- Ngoài ra, có thể thấy trứng của rận bám trên thân lông.

V. NHỮNG SAI XÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Cần phân biệt rận mu với: Chấy, Ghẻ và các loại Rận trên súc vật.

- Người bệnh dùng thuốc diệt ký sinh trùng

2. Xử trí

- Khi tìm thấy rận mu theo đúng mô tả như trên là tiêu chuẩn chẩn đoán xác định.

- Người bệnh bôi thuốc diệt ký sinh trùng phải ngừng từ 3-5 ngày.

203. *Phthirus pubis* (Rận mu) nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện hình thái ký sinh trùng *Rận* gây bệnh ngoài da

2. Nguyên lý

Dưới tác dụng của glycerin hoặc dầu thực vật bộc lộ hình thái *Rận*

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- 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	Số lượng
1	Lá kính	Cái	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Lam kính (kiểm chuẩn)	Cái	0,200
4	Dung dịch KOH 10%	ML	1,000
5	Dao cùn	Cái	2,000
6	Bông	Kg	0,001
7	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ML	10,000
8	Kính lúp	ML	10,000
10	Đèn cồn	Cái	0,0001
11	Panh	Cái	0,0001
12	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
13	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001

14	Mũ	Cái	0,020
15	Khẩu trang	Cái	0,020
16	Găng tay	Đôi	3,000
17	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
18	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
19	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Bật lửa	Cái	0,010
23	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
24	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
25	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
26	Khăn lau tay	Cái	0,030
27	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

5. Bệnh phẩm

Vẩy da.

6. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Dùng kính lúp soi vùng lông và da mu, chú ý vùng chân lông tìm rận mu, thân lông để tìm ấu trùng hoặc trứng. Sau đó, dùng lược mau chải từ chân lông ra ngọn một cách nhẹ nhàng và hứng vào 1 tờ giấy trắng.

- Có thể dùng dao cùn cạo vùng lông và da mu, hứng vào lam kính

- Nhỏ 1 giọt KOH 20%, hoặc dầu Parafin, đặt lamén, soi ngay dưới kính hiển vi quang học.

Thực hiện xét nghiệm trong 5 phút và đọc kết quả sau 10 phút

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Dùng vật kính 10X để quan sát

- Rận mu:

+ Cơ thể chia làm 3 phần rõ rệt: Đầu có vòi, ăng ten, mắt đơn, ngực có 3 đốt, bụng có 9 đốt.

+ Rận trưởng thành có 3 cặp chân, ấu trùng có 4 cặp chân đối xứng nhau.

- Ngoài ra, trên tiêu bản có thể thấy trứng rận bám trên thân lông.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Lấy bệnh phẩm tại thương tổn không điển hình
- Bệnh phẩm quá dày hoặc quá mỏng
- Phân biệt với Rận gây bệnh ở súc vật: Rận, Ghẻ chó, mèo...
- Người bệnh bôi thuốc diệt ký sinh trùng

2. Xử trí

- Chọn thương tổn điển hình (như mô tả)
- Dùng ngón trỏ dàn mỏng bệnh phẩm
- Nhận định hình thái điển hình ký sinh trùng rận (như mô tả trên)
- Người bệnh không bôi thuốc diệt ký sinh trùng trước đó 3-5 ngày.

204. *Sarcoptes scabies hominis* (Ghẻ) soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện hình thái ký sinh trùng ghẻ gây bệnh ngoài da

2. Nguyên lý

Dưới tác dụng của KOH 10% biểu mô sừng mềm và mỏng do đó bộc lộ hình thái ghẻ.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện : Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- 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	Số lượng
1	Lá kính	Cái	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Lam kính (kiểm chuẩn)	Cái	0,200
4	Dung dịch KOH 10%	Ml	1,000
5	Dao cùn	Cái	2,000
6	Bông	Kg	0,001
7	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	Ml	10,000
8	Đèn cồn	Cái	0,0001
9	Panh	Cái	0,0001
10	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
11	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001

12	Mũ	Cái	0,020
13	Khẩu trang	Cái	0,020
14	Găng tay	Đôi	3,000
15	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
15	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
16	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
17	Bút viết kính	Cái	0,020
18	Bút bi	Cái	0,010
19	Bật lửa	Cái	0,010
20	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
21	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
22	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
23	Khăn lau tay	Cái	0,030
24	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

QC ký sinh trùng *Demodex*: Có bộ tiêu bản mẫu

3. Bệnh phẩm

Vảy da.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu 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

- Xác định luống ghẻ
- Làm test BI
- Nhỏ dung dịch KOH 10%, đẩy lamén xem dưới kính hiển vi.

Thực hiện kỹ thuật trong 5 phút và nhận định kết quả trong 10 phút.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Cái ghẻ:

+ Hình thái: Cơ thể chia làm 3 phần rõ rệt. Hình dạng bầu dục, màu trắng xám, miệng ngắn lưng gồ.

+ Con trưởng thành có 4 cặp chân, ấu trùng có 3 cặp chân đối xứng nhau

+ Ngoài ra, thấy các thành phần khác như: Trứng, ấu trùng hoặc chất thải của Ghẻ.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Lấy bệnh phẩm tại thương tổn không điển hình
- Bệnh phẩm nhiều vảy da
- Bệnh phẩm quá dày hoặc quá mỏng
- Phân biệt với ghẻ gây bệnh ở súc vật: ghẻ chó, mèo...
- Người bệnh bôi thuốc diệt ký sinh trùng

2. Xử trí

- Chọn thương tổn điển hình (như mô tả)
- Dùng ngón trỏ dàn mỏng bệnh phẩm
- Nhận định hình thái điển hình ký sinh trùng ghẻ (như mô tả trên)
- Người bệnh không bôi thuốc diệt ký sinh trùng trước đó 3-5 ngày.

205. *Sarcoptes scabies hominis* (Ghẻ) nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện hình thái ghẻ gây bệnh ngoài da

2. Nguyên lý

Dưới tác dụng của glycerin hoặc dầu thực vật bộc lộ hình thái ghẻ

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Bàn lấy bệnh phẩm
- Hộp đựng dao cùn đã tiệt trùng
- Giá đựng lam
- Kính núp

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	Dao cùn đã tiệt trùng	Cái	1,000
2	Dầu thực vật	Ml	2,000
3	Lam kính, lá kính	Cái	1,000
4	Găng tay	Đôi	1,000
5	Bút viết kính	Cái	1,000
6.	Dung dịch Xanhmetylen	Ml	2,000

3. Bệnh phẩm

Vẩy da

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

- Cạo vảy da bằng dao cùn
- Xác định luống ghẻ:
 - + Là đường chỉ nhỏ ngoằn ngoèo dài từ 3 đến 10 mm
 - + Có màu xám hoặc đen
 - + Cuối luống ghẻ là điểm phình to
 - + Lấy dao cùn cạo sâu vào da có thể bắt được cái ghẻ
- Ngoài ra nên lấy nhiều vị trí khác:
 - + Kẽ tay
 - + Nếp lằn vú
 - + Vùng bẹn
 - + Mông
 - + Quy đầu

2. Tiến hành kỹ thuật

2.2. Làm test Burown ink

- Nhỏ 2-3 giọt Xanhmetylen vào điểm đầu đường hầm (rãnh ghẻ)
- Giữ yên trong thời gian 10 - 15 phút
- Sau đó đem soi ngay dưới ánh đèn

2.3. Dùng dao cùn cạo vào điểm phình to cuối luống ghẻ

2.4. Phết lên lam đã nhỏ sẵn 1 giọt dầu thực vật

2.5. Đậy lamên, soi dưới kính hiển vi quang học.

Thực hiện kỹ thuật trong 10 phút và đọc kết quả sau 5 - 10 phút

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Dùng vật kính 10X để xác định:

- Cái ghẻ
 - + Hình thể: Cơ thể không chia làm 3 phần rõ rệt. Hình dạng bầu dục, màu trắng xám, miệng ngắn, lưng gồ và không có mắt, đầu có vòi hút thức ăn, đồng thời đào hầm vào thượng bì.
 - + Con trưởng thành có 4 cặp chân, ấu trùng có 3 cặp chân, đối xứng nhau.
 - + Kích thước: Cái ghẻ: 330 - 250µm. Ghẻ đực : 220 - 150µm
- Trong dầu thực vật cái ghẻ di động được dễ dàng

- Ngoài ra, ta còn thấy các thành phần khác của ghẻ như: Trứng, ấu trùng hoặc chất thải của ghẻ.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Bệnh phẩm nhiều vảy da nên khó nhận định khi soi trong dầu hay glycerin.
- Lấy thương tổn không điển hình và ít vị trí
- Phân biệt với các loại Ghẻ khác gây bệnh cho súc vật như: Ghẻ chó, mèo
- Người bệnh bôi thuốc diệt ký sinh trùng.

2. Xử trí

- Đối với Ghẻ tạng sùng (Ghẻ Na-uy) có thể cạo bỏ lớp vảy da, sau đó dùng kính lúp soi vào vùng thương tổn để cạo vảy và đôi khi có thể thấy rất nhiều cái ghẻ.

- Chọn thương tổn điển hình và lấy nhiều vị trí. Mỗi vị trí một lam
- Khi tìm thấy được cái ghẻ với đặc điểm mô tả như trên là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán xác định. Ngoài ra, trên tiêu bản có thể thấy ấu trùng, trứng, phân hoặc một trong các loại trên.
- Người bệnh bôi thuốc diệt ký sinh trùng phải ngừng từ 3-5 ngày.

206. *Cysticercus cellulosae* (Sán lợn) **Ấu trùng soi mảnh sinh thiết**

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

Phát hiện các ấu trùng *Cysticercus cellulosae* (sán lợn) trong mảnh sinh thiết.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Lam kính (QC)	Cái	0,200
4	Băng dính trắng	Cuộn	0,010
5	Xylen lau kính	ml	1,000
6	Dung dịch NaCl 0,9%	ml	1,000
7	Dung dịch NaCl 0,9% (kiểm chuẩn)	ml	0,200
8	Bông	Kg	0,001
9	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
10	Cồn 70 độ (sát trùng)	ml	5,000
11	Đèn cồn	Cái	0,0001
12	Panh	Cái	0,0001
13	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
14	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001

15	Mũ	Cái	0,020
16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	3,000
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
20	Axit ngậm lam	ml	10,000
21	Bút viết kính	Cái	0,020
22	Bút bi	Cái	0,010
23	Bật lửa	Cái	0,010
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
25	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
26	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
27	Khăn lau tay	Cái	0,030
28	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Tổn thương da hoặc các tổ chức, cơ quan, bộ phận trong cơ thể,... nghi ngờ có ấu trùng *Cysticercus cellulosae* (sán lợn)

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

Mảnh sinh thiết nguyên tổ chức khối u, nghi ngờ có ấu trùng *Cysticercus cellulosae*, tổ chức không bị vỡ.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

- Dùng dao tách nhẹ nhàng khối u, bóc lộ từ ngoài vào trong, đến khi gặp tổ chức khác thường so với xung quanh (cục trắng giống hạt đu đủ non), thì nhẹ nhàng tách bỏ tổ chức đó ra khỏi khối u và đặt lên lam kính.

- Dùng một lam kính khác, đặt lên lam kính có tổ chức rồi ép nhẹ 2 lam kính

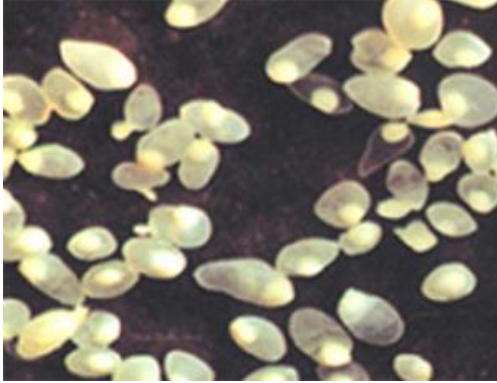
- Dùng băng dính trắng, quấn 2 đầu của 2 lam ép, kết thúc quá trình làm lam.

2.2. Soi tìm ấu trùng dưới kính hiển vi quang học.

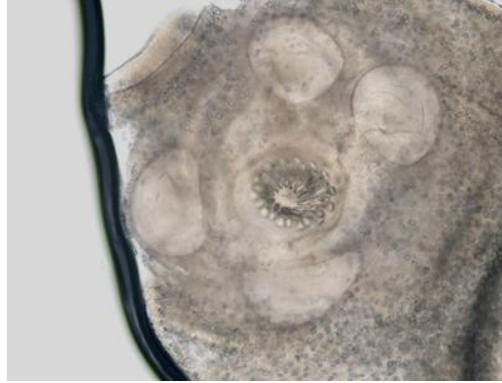
Soi kính hiển vi vật kính 10X

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Ấu trùng cư trú ở cơ vân: xuất hiện các nang dưới da với kích thước 17-20 x 7-10 mm, màu trắng đục nang chứa nước và có một đầu sán cùng với đốt cổ lộn vào bên trong, đầu có 4 giác và 2 vòng móc.



Nang ấu trùng *Cysticercus cellulosae*



Đầu ấu trùng

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Tách bệnh phẩm không đúng vị trí có ấu trùng, hoặc đúng nhưng không còn nguyên vẹn ấu trùng. Khắc phục bằng cách làm cẩn thận và chính xác.

207. *Gnathostoma* ấu trùng soi mảnh sinh thiết

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

Phát hiện ấu trùng *Gnathostoma* bằng phương pháp soi mảnh sinh thiết.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2.000
3	Lam kính (QC)	Cái	0,200
4	Băng dính trắng	Cuộn	0,010
5	Xylen lau kính	ml	1,000
6	Dung dịch NaCl 0,9%	ml	1,000
7	Dung dịch NaCl 0,9% (QC)	ml	0,200
8	Bông	Kg	0,001
9	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
10	Cồn 70 độ (sát trùng)	ml	5,000
11	Đèn cồn	Cái	0,0001
12	Panh	Cái	0,0001
13	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
14	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
15	Mũ	Cái	0,020

16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	3,000
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
20	Axit ngậm lam	ml	10,000
21	Bút viết kính	Cái	0,020
22	Bút bi	Cái	0,010
23	Bật lửa	Cái	0,010
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
25	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
26	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
27	Khăn lau tay	Cái	0,030
28	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Tổn thương các tổ chức dưới da, các đường hầm dưới da hoặc các ổ áp xe dưới da nghi ngờ có ấu trùng *Gnathostoma*.

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

- Mảnh sinh thiết hoặc dịch ổ áp xe.
- Yêu cầu bệnh phẩm: Nếu tổ chức sinh thiết dưới da thì lấy đầy đủ cục u sinh thiết, không bị vỡ. Nếu bệnh phẩm là dịch ổ áp xe thì dùng bơm kim tiêm to hút dịch hoặc dùng các dụng cụ chuyên dụng khác lấy dịch bệnh phẩm cho vào ống đựng bệnh phẩm.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

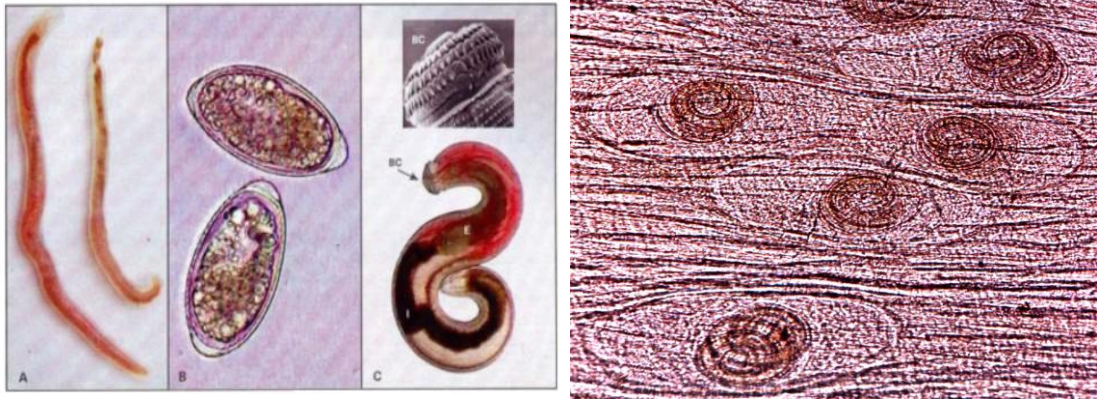
- Nếu bệnh phẩm là tổ chức sinh thiết dưới da thì dùng dao tách nhẹ để tổ chức lên lam kính, dùng một lam kính khác ép nhẹ và dùng băng dính trắng quấn hai đầu lam.
- Nếu bệnh phẩm là dịch ổ áp xe thì lấy dịch cho lên lam kính và ép lam giống như trên để soi kính hiển vi.

2.2. Soi tìm ấu trùng dưới kính hiển vi quang học

Soi kính hiển vi quang học vật kính 10X hoặc 40X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Ấu trùng có kích thước 3-4 mm xuất hiện trong mô hoặc trong ổ áp xe.
- Hình thể không cân đối một đầu to, một đầu nhỏ. Đầu có 4 hàng gai, chạy theo chiều ngang, gai to, thô, miệng gồm 2 môi.



V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Tách bệnh phẩm không đúng vị trí có ấu trùng, hoặc đúng nhưng không còn nguyên vẹn ấu trùng. Khắc phục bằng cách làm cẩn thận và chính xác.
- Nếu dịch, lấy không đúng chỗ tổn thương, có ít hoặc không có ấu trùng. Khắc phục bằng cách lấy đúng vị trí và lấy nhiều bệnh phẩm, làm nhiều lần để tránh bỏ sót.

208. *Taenia* (Sán dây) soi tươi định danh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

Phân biệt đốt sán dây bò và đốt sán dây lợn bằng phương pháp quan sát sự khác nhau về cấu trúc của đốt sán được nhuộm bằng mực tàu.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Lam kính (kiểm chuẩn)	Cái	0,200
4	Băng dính trắng	Cuộn	0,010
5	Xylen lau kính	ml	1,000
6	Dung dịch NaCl 0,9%	ml	1,000
7	Dung dịch NaCl 0,9% (kiểm chuẩn)	ml	0,200
8	Bông	Kg	0,001
9	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
10	Cồn 70 độ (sát trùng)	ml	5,000
11	Đèn cồn	Cái	0,0001
12	Panh	Cái	0,0001
13	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
14	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
15	Mũ	Cái	0,020

16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	3,000
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
20	Axit ngậm lam	ml	10,000
21	Bút viết kính	Cái	0,020
22	Bút bi	Cái	0,010
23	Bật lửa	Cái	0,010
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
25	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
26	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
27	Khăn lau tay	Cái	0,030
28	Mực tàu	Lọ	0,100
29	Bơm tiêm 1ml	cái	1,000
30	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Đốt sán già theo phân ra ngoài hoặc tự ra ngoài.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Lấy bệnh phẩm phân có đốt sán hoặc đốt sán tự do không theo phân.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

- Dùng 1 lam kính đặt 1 đốt sán già lên lam kính, dùng một lam kính khác đặt lên đốt sán và ép nhẹ.
- Lấy băng dính trắng quấn chặt 2 đầu lam kính
- Dùng bơm tiêm 10, tiêm mực tàu vào lỗ sinh dục, để cho mực tàu thấm vào các nhánh tử cung.

2.2. Quan sát

Bằng mắt thường để quan sát chiều dài đốt sán và dưới kính hiển vi quang học vật kính 10X hoặc 40X để đếm số lượng nhánh tử cung.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Sán dây lợn: Đốt già dài 10-12 mm, tử cung chia 6-12 nhánh
2. Sán dây bò: Đốt già dài 18-20 mm, tử cung chia 18-35 nhánh.



Đốt sán dây bò
(*Taenia saginata*)



Đốt sán dây lợn
(*Taenia solium*)

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quá trình tiêu phải chính xác đảm bảo mực tàu thấm hết cổ lượng nhánh tử cung, như vậy đếm mới chính xác số lượng nhánh tử cung.

209. *Toxocara* (Giun đũa chó, mèo) soi mảnh sinh thiết

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

Phát hiện các ấu trùng *Toxocara* (giun đũa chó, mèo) bằng phương pháp soi mảnh sinh thiết.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Lò hấp dụng cụ phẫu thuật

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Lam kính (kiểm chuẩn)	Cái	0,200
4	Băng dính trắng	Cuộn	0,010
5	Xylen lau kính	ml	1,000
6	Dung dịch NaCl 0,9%	ml	1,000
7	Dung dịch NaCl 0,9% (kiểm chuẩn)	ml	0,200
8	Bông	Kg	0,001
9	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
10	Cồn 70 độ (sát trùng)	ml	5,000
11	Đèn cồn	Cái	0,0001
12	Panh	Cái	0,0001
13	Dao mổ (dao tiểu phẫu)	Cái	1,000

14	Chỉ khâu	Sợi	1,000
15	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
16	Thuốc gây tê	Ống	1,000
17	Khay quả đậu	Cái	0,0001
18	Khăn phẫu thuật	cái	1,000
19	Gạc vô khuẩn	cái	2,000
20	Băng dính vải	Cuộn	0,010
21	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
22	Mũ	Cái	0,020
23	Khẩu trang	Cái	0,020
24	Găng tay	Đôi	3,000
25	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
26	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
27	Axit ngậm lam	ml	10,000
28	Bút viết kính	Cái	0,020
29	Bút bi	Cái	0,010
30	Bật lửa	Cái	0,010
31	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
32	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Khăn lau tay	Cái	0,030
35	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Sinh thiết gan ở các u hạt, phổi, não, thận, nghi ngờ có ấu trùng *Toxocara* (giun đũa chó, mèo).

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Bệnh phẩm là mảnh sinh thiết gan ở các u hạt, phổi, não, thận, nghi ngờ có ấu trùng *Toxocara*.

Yêu cầu bệnh phẩm sinh thiết phải nguyên vẹn các u hạt.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

- Làm tiêu bản bằng phương tách bệnh phẩm sinh thiết và lấy các u hạt
- Đặt u hạt lên lam kính và dùng 1 lam kính khác ép nhẹ
- Lấy băng dính trắng quấn 2 đầu lam kính.

2.2. Soi tìm ấu trùng dưới kính hiển vi quang học.

Soi kính hiển vi vật kính 10X hoặc 40X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Ấu trùng có kích thước kích thước 0,5-1mm xuất hiện trong bệnh phẩm sinh thiết.



V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Bệnh phẩm lấy không đúng chỗ tổn thương hoặc lấy nhưng các u hạt bị vỡ không còn nguyên vẹn, hoặc lấy nguyên vẹn nhưng khi tiến hành làm thì bị vỡ hoặc không đầy đủ. Khắc phục bằng cách lấy cẩn thận và chính xác.

210. *Trichinella spiralis* (Giun xoắn) soi mảnh sinh thiết

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

Phát hiện các ấu trùng *Trichinella spiralis* (giun xoắn) trong mảnh sinh thiết.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Lam kính (QC)	Cái	0,200
4	Băng dính trắng	Cuộn	0,010
5	Xylen lau kính	ml	1,000
6	Dung dịch NaCl 0,9%	ml	1,000
7	Dung dịch NaCl 0,9% (QC)	ml	0,200
8	Bông	Kg	0,001
9	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
10	Cồn 70 độ (sát trùng)	ml	5,000
11	Đèn cồn	Cái	0,0001
12	Panh	Cái	0,0001
13	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
14	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
15	Mũ	Cái	0,020

16	Khẩu trang	Cái	0,020
17	Găng tay	Đôi	3,000
18	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
19	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
20	Axit ngậm lam	ml	10,000
21	Bút viết kính	Cái	0,020
22	Bút bi	Cái	0,010
23	Bật lửa	Cái	0,010
24	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
25	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
26	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
27	Khăn lau tay	Cái	0,030
28	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Tổn thương cơ (thường gặp là cơ ở cơ đùi, cẳng chân) hoặc các tổ chức, cơ quan, bộ phận trong cơ thể, nghi ngờ có ấu trùng *Trichinella spiralis* (giun xoắn)

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Mảnh sinh thiết.

Yêu cầu bệnh phẩm là các nang trong tổ chức cơ, lấy nguyên vẹn các nang nghi ngờ.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị tiêu bản

- Dùng dao tách nhẹ nhàng nang và đặt lên lam kính
- Dùng một lam kính khác, đặt lên lam kính có nang rồi ép nhẹ 2 lam kính
- Dùng băng dính trắng, quấn 2 đầu của 2 lam ép, kết thúc quá trình làm lam

2.2. Soi tìm ấu trùng

Quan sát ấu trùng ở vật kính 10X hoặc 40X .

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Ấu trùng cư trú ở cơ dóp, căng chân, xuất hiện các nang với kích thước 900-1300 x 35-49 μm , thường cuộn lại như vòng xoắn lò xo trong một nang hình quả cau ở tổ chức, trong một nang có thể có 2-3 ấu trùng.



V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Tách bệnh phẩm không đúng vị trí có ấu trùng, hoặc đúng nhưng không còn nguyên vẹn ấu trùng. Khắc phục bằng cách làm cẩn thận và chính xác.

211. *Trichomonas vaginalis* soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện *Trichomonas vaginalis* gây bệnh đường sinh dục

2. Nguyên lý

Trichomonas vaginalis được phát hiện qua hình thể, kích thước, tính chất di động trong môi trường có NaCL 9‰ soi dưới kính hiển vi quang học.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2

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	Lá kính	Cái	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Lam kính (QC)	Cái	0,200
4	Nước muối sinh lý 0,9%	Ml	1,000
5	Mỏ vệt	Cái	2,000
6	Bông	Kg	0,001
7	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	Ml	10,000
8	Bàn phụ khoa	Cái	1,000
10	Đèn cồn	Cái	0,0001
11	Panh	Cái	0,0001
12	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
13	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001

14	Mũ	Cái	0,020
15	Khẩu trang	Cái	0,020
16	Găng tay	Đôi	3,000
17	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
18	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
19	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
20	Bút viết kính	Cái	0,020
21	Bút bi	Cái	0,010
22	Bật lửa	Cái	0,010
23	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
24	Cồn sát trùng tay nhanh	Ml	2,000
25	Dung dịch nước rửa tay	Ml	8,000
26	Khăn lau tay	Cái	0,030
27	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Khí hư âm đạo

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu 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

Bệnh phẩm sau khi lấy hoà vào giọt nước muối sinh lý 0,9% đã nhỏ sẵn trên lam kính. Đậy lá kính soi ngay trên kính hiển vi quang học.

Thực hiện kỹ thuật trong 10 phút và đọc kết quả sau 3-5 phút

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Quan sát kính hiển vi quang học vật kính 10X, 40X

- Hình thể trùng roi giống hạt chanh, di động xoay tròn
- Có 5 roi: 4 roi trước, 1 roi sau
- Chiều dài 10-20µm. Chiều rộng 5-12 µm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Phân biệt trùng roi với bọt khí, bạch cầu
- Trùng roi nhanh chết ở nhiệt độ phòng
- Bệnh phẩm quá dày

2.Xử trí

- Hình thái trùng roi và tính chất di động điển hình như mô tả trên
- Dùng ngón tay ấn nhẹ vào giữa lam đuổi bọt khí ra rìa tiêu bản
- Lau bớt dịch tiết và hòa đều bệnh phẩm vào giọt nước muối sinh lý.

212. *Trichomonas vaginalis* nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện *Trichomonas vaginalis* gây bệnh đường sinh dục

2. Nguyên lý

Trichomonas vaginalis được phát hiện qua hình thể, kích thước cấu tạo khi nhuộm HE, soi dưới kính hiển vi quang học.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- 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	Số lượng
1	Lam kính	Cái	2,000
2	Lam kính (QC)	Cái	0,200
3	Mỏ vệt	Cái	2,000
4	Bông	Kg	0,001
5	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	Ml	10,000
6	Bàn phụ khoa	Cái	1,000
7	Đèn cồn	Cái	0,0001
8	Panh	Cái	0,0001
9	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
11	Mũ	Cái	0,020

12	Khẩu trang	Cái	0,020
13	Găng tay	Đôi	3,000
14	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
15	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
16	Bút viết kính	Cái	0,020
17	Bút bi	Cái	0,010
18	Bật lửa	Cái	0,010
19	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
20	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
21	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
22	Khăn lau tay	Cái	0,030
23	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
24	Eosin	ml	5,000
25	Hematoxylin	ml	5,000
26	Cồn acid HCL1%	ml	10,000

3. Bệnh phẩm

Khí hư âm đạo

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

Bệnh phẩm sau khi lấy dần mỏng trên lam kính sau đó tiến hành nhuộm: rửa nước, Hematoxylin 3-5 phút, tẩy cồn acid 3-5 phút, gắn lá kính. Soi trên kính hiển vi quang học.

Thực hiện kỹ thuật trong 10 -15 phút và đọc kết quả sau 10 phút

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Quan sát kính hiển vi quang học ở vật kính 10X, 40X thấy

- Hình thể trùng roi giống hạt chanh
- Có 5 roi: 4 roi trước, 1 roi sau
- Chiều dài 10-20µm. Chiều rộng 5-12 µm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

- Phân biệt Trùng roi với bạch cầu
- Tẩy acid quá lâu làm mất màu của trùng roi
- Bệnh phẩm quá dày

2.Xử trí

- Nhận biết hình thể trùng roi điển hình như mô tả.
- Thực hiện đúng kỹ thuật nhuộm
- Dàn bệnh phẩm đúng kỹ thuật

213. *Pneumocystis jirovecii* nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện *Pneumocystis jirovecii* có trong bệnh phẩm.

2. Nguyên lý

Phát hiện *Pneumocystis jirovecii* bằng kỹ thuật nhuộm bạc dựa vào hình thể, kích thước, cấu tạo.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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.

- Bộ thuốc nhuộm Bạc bao gồm: Dung dịch acid Chromic hoặc acid Perioric; Dung dịch nhuộm Bạc; Dung dịch Gold clorid 0,1%; Dung dịch Bouins; Dung dịch Thiosunphat; Dung dịch Chromotrope 5%.
- Nước cân bằng

2.1. Trang thiết bị

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy lắc
- Máy ly tâm 3000 vòng/phút
- Tủ ấm 60-70 độ C

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.	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2.	Lam kính	Cái	2,000
3.	Lam kính kiểm chuẩn	Cái	0,200
4.	Dầu kính	ml	1,000
5.	Xylen lau kính	ml	1,000
6.	Dung dịch NaCl 0,9%	ml	1,000

7.	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
8.	Que cấy	cái	1,000
9.	Đèn cồn	Cái	0,0001
10.	Bộ thuốc nhuộm Bạc	ml	1,000
11.	Dung dịch đệm	ml	10,000
12.	Que cấy	Cái	1,000
13.	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
14.	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
15.	Mũ	Cái	0,020
16.	Bông	kg	0,001
17.	Khẩu trang	Cái	0,020
18.	Găng tay	Đôi	3,000
19.	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
20.	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
21.	Axit ngậm lam	ml	10,000
22.	Bút viết kính	Cái	0,020
23.	Bút bi	Cái	0,010
24.	Bật lửa	Cái	0,010
25.	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26.	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	2,000
27.	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
28.	Khăn lau tay	Cái	0,030
29.	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Đờm, dịch rửa phế quản, phế nang, hoặc sinh thiết phổi.

4. Phiếu xét nghiệm

Điền đầy đủ thông tin theo mẫu phiếu yêu cầu.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

- Đờm, dịch rửa phế quản, phế nang, hoặc sinh thiết phổi.
- Nếu bệnh phẩm là dịch hoặc đờm thì lấy 2-5ml.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Chuẩn bị bệnh phẩm: Xử lý bệnh phẩm

- Đối với dịch rửa phế quản, dịch màng phổi: lấy khoảng 2 ml vào ống thủy tinh ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút x 10 phút, lấy cạn.

- Đối với bệnh phẩm đờm: lấy khoảng 1ml đờm, cho thêm 1 ml nước muối sinh lý 0.9%, làm tan đờm bằng máy lắc hoặc đũa lắc thủy tinh sau đó ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút x 10 phút, lấy cạn.

2.2. Làm tiêu bản

Dùng que cấy lấy bệnh phẩm đã ly tâm lấy cạn dàn tiêu bản lên lam kính (đường kính từ 1 – 1,5 cm) và để khô tự nhiên.

2.3. Các bước nhuộm

- Ngâm lam trong dung dịch acid Chromic hoặc acid Perioric – 1 giờ, rồi rửa nước

- Ngâm trong dung dịch nhuộm Bạc – 1 giờ, rồi rửa nước

- Ngâm trong dung dịch Gold clorid 0,1% - 1 phút, rửa nước

- Ngâm trong dung dịch Bouins – 5 phút, rửa nước

- Ngâm trong dung dịch Thiosunphat – 2 phút, rửa nước

- Ngâm trong dung dịch Chromotrope 5% – 15 phút, rửa nước

- Để khô tự nhiên và soi vật kính dầu với vật kính 100X

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Có 4 hình thể khác nhau

- Thể hoạt động dạng nhỏ (đơn bội): Có hình quả trứng hoặc hình lưỡi liềm, kích thước 1-3 μm , có một nhân ở giữa, tế bào chất đậm đặc.

- Thể hoạt động dạng lớn (lưỡng bội): Có hình thể không đều, kích thước > 4 – 10 μm , có một nhân và tế bào chất loãng hơn.

- Thể tiền bào nang: Hình quả trứng, kích thước 3,5 - 5,5 μm , thành ngoài rất dày, thường nhăn và đều, nhân chia nhiều mảnh (2 – 8 mảnh).

- Thể bào nang: hình tròn, kích thước 4 – 8 μm , thành bào nang tiếp tục dày thêm, bên trong có 8 ký sinh trùng non hoàn chỉnh. Mỗi ký sinh trùng con có một nhân, tế bào chất và một màng mỏng bao quanh. Các thể trong bào nang có hình tròn, quả chuối, hoặc dạng amíp.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Sai sót

Bệnh phẩm dịch lấy không đúng kỹ thuật, mảnh sinh thiết không đúng chỗ bị tổn thương, bệnh phẩm đờm lấy không đúng kỹ thuật (chỉ có nước bọt), đờm không qua xử lý làm tan sẽ không ly tâm lấy cạn được.

2. Xử trí: Lấy bệnh phẩm và thao tác đúng kỹ thuật.

214. Vi nấm soi tươi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Nhận định sơ bộ vi nấm.

2. Nguyên lý

Nhận định sơ bộ vi nấm dựa vào hình thể, kích thước, cấu tạo và tính chất bắt màu.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy li tâm

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Lam kính	Cái	2,000
3	Lá kính	Cái	2,000
4	Bông	Kg	0,001
5	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
6	Panh	Cái	0,0001
7	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
9	Hóa chất (KOH, mực tàu, nước muối sinh lý)	ml	5,000
10	Pipet nhựa	Cái	2,000
11	Axit ngâm lam	ml	10,000

12	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
13	Mũ	Cái	0,020
14	Khẩu trang	Cái	0,020
15	Găng tay	Đôi	3,000
16	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
17	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
18	Bút viết kính	Cái	0,020
19	Bút bi	Cái	0,010
20	Bật lửa	Cái	0,010
21	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
22	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
23	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
24	Khăn lau tay	Cái	0,010
25	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
26	QC (nếu thực hiện) *		0,1
27	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Máu, dịch, mủ, đờm, phân, nước tiểu, da, tóc, móng.

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 5).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Lấy bệnh phẩm cho lên lam kính: tùy từng loại bệnh phẩm sử dụng hóa chất khác nhau.

- Bệnh phẩm da, tóc, móng: Lấy bệnh phẩm lên lam kính, nhỏ dung dịch KOH 20% lên trên bệnh phẩm.
- Bệnh phẩm dịch tiết(lấy bằng que tăm bông), phân, đờm: Nhỏ NaCl 9% lên trên lam kính, lấy bệnh phẩm hòa lên trên giọt dung dịch đến khi đục.
- Bệnh phẩm là dịch não tủy nghi ngờ nhiễm *Cryptococcus spp* làm tiêu bản bằng mực tàu.
- Đối với bệnh phẩm là các chất dịch lỏng lấy trực tiếp bệnh phẩm lên lam kính.

2.2. Lấy lá kính đặt lên trên giọt dung dịch.

2.3. Quan sát kính hiển vi vật kính 10X - 40X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

- Tế bào nấm men hình tròn hoặc bầu dục kích thước 3- 5µm nảy chồi hoặc không.
- Tế bào nấm men có quầng sáng bao quanh khi làm tiêu bản mực tàu.
- Sợi nấm giả (Sợi nhánh được tạo thành từ các chỗi thắt).
- Nấm sợi có vách ngăn (sợi nhánh được tách ra cách vách ngăn).

2. Âm tính

Không thấy vi nấm.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Đối với bệnh phẩm da, tóc, móng để thời gian ngắn chưa tan hết phải để thêm thời gian.
- Tiêu bản mực tàu làm quá đen phải pha thêm nước muối sinh lý.

215. Vi nấm test nhanh

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện vi nấm

2. Nguyên lý

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

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Tủ an toàn sinh học 2
- Micropipette
- Đồng hồ bấm giây
- Máy ly tâm thường

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	Ống lấy bệnh phẩm	Ống	1,000
2	Bơm tiêm	Cái	1,000
3	Bông	Kg	0,001
4	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	Ml	10,000
5	Panh	Cái	0,0001
6	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
7	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
8	Hóa chất chính	Test	1,000
9	Khẩu hao sinh phẩm cho chạy chứng và kiểm tra chất lượng	Test	0,400

10	Đầu côn vàng	Cái	2,000
11	Axit ngâm rửa	Ml	10,000
12	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
13	Mũ	Cái	0,020
14	Khẩu trang	Cái	0,020
15	Găng tay	Đôi	2,000
16	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
17	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
18	Bút viết kính	Cái	0,020
19	Bút bi	Cái	0,010
20	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
21	Cồn sát trùng tay nhanh	Ml	1,000
22	Dung dịch nước rửa tay	Ml	8,000
23	Khăn lau tay	Cái	0,010
24	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Dịch não tủy, 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 TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm

Theo đúng quy định của chuyên ngành Vi sinh (xem Phụ lục 5).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Ly tâm ống bệnh phẩm (nếu bệnh phẩm là máu)

2.2. Nhỏ dung dịch pha loãng vào tube sạch

2.3. Nhỏ bệnh phẩm vào tube có dung dịch pha loãng, ghi mã bệnh phẩm tương ứng

2.4. Cắm thanh xét nghiệm vào tube, đọc kết quả đúng thời gian qui định

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Kết quả được chấp nhận khi xuất hiện màu rõ ràng, sắc nét ở vạch chứng C

+ Dương tính khi xuất hiện màu ở vạch C và vạch T

+ Âm tính khi xuất hiện màu ở vạch chứng C và không xuất hiện màu ở vạch T.

+ Không có giá trị: Vạch chứng C không xuất hiện sau thời gian qui định thì cần kiểm tra lại hóa chất, các bước thực hiện, làm lại test khác.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Đọc kết quả trước hoặc sau thời gian qui định có thể làm sai lệch kết quả.
- Cho quá ít bệnh phẩm, hay quá nhiều dung dịch pha loãng có thể ảnh hưởng đến nhận định kết quả.
- Tham khảo thêm hướng dẫn của nhà sản xuất.

216. Vi nấm nhuộm soi

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện *Pneumocystis jirovecii*

2. Nguyên lý

Pneumocystis jirovecii được phát hiện nhờ hình thể, kích thước, tính chất bắt màu khi nhuộm TBO (Toluidine Blue O).

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh – Ký sinh trùng

2. Phương tiện, hóa chất

2.1. Trang thiết bị

Kính hiển vi quang học

Tủ an toàn sinh học cấp 2

Máy ly tâm

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que lấy bệnh phẩm	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	1,000
5	Bông	Kg	0,001
6	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
7	Panh	Cái	0,0001
8	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
9	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
10	Dung dịch TBO	ml	3,000
11	Pipet nhựa	Cái	2,000
12	Axit ngậm lam	ml	10,000
13	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000

14	Mũ	Cái	0,020
15	Khẩu trang	Cái	0,020
16	Găng tay	Đôi	3,000
17	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
18	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
19	Bút viết kính	Cái	0,020
20	Bút bi	Cái	0,010
21	Bật lửa	Cái	0,010
22	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
23	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
24	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
25	Khăn lau tay	Cái	0,010
26	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
27	QC (nếu thực hiện) *		0,1
28	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Đờm, dịch phế quản.

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 5).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Lấy bệnh phẩm phết lên lam kính, để khô.

2.2. Phủ thuốc nhuộm TBO lên trên bệnh phẩm.

2.3. Rửa nước, để khô.

2.4. Quan sát kính hiển vi vật kính 40X- 100X.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Dương tính

- Thể hoạt động *Pneumocystis jirovecii* kích thước từ 1- 4 μ m.
- Thể bào nang bắt màu xanh tím hình tròn vỏ mỏng kích thước 1- 7 μ m bên trong có từ 1-8 nhân.

2. Âm tính

Không tìm thấy *Pneumocystis jirovecii*.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Tiêu bản bị bong .
- Xử trí
- Khi phết lam phải để bệnh phẩm khô mới tiến hành nhuộm.

217. Vi nấm nuôi cấy và định danh bằng phương pháp thông thường

I. MỤC ĐÍCH, NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Định danh vi nấm gây bệnh

2. Nguyên lý

Nuôi cấy, định danh vi nấm dựa trên các tính chất về hình thể, cấu tạo, bắt màu và một số tính chất sinh vật, hóa học của nấm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm.
- Tủ ẩm.
- Máy tính cài phần mềm đọc API (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	Số lượng
1	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Lá kính	Cái	1,000
5	Lactophenol Coton Blue	Ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	Ml	5,000
7	KOH 20 %	Ml	5,000
8	Mực tàu	Ml	0,500
9	Sabouraud	Đĩa	1,000
10	Candiselect	Đĩa	0,500
11	Giá đường API	Test	0,500
12	RAT	Ống	1,000
13	Bông	Kg	0,001
14	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000

15	Đèn cồn	Cái	0,0001
16	Panh	Cái	0,0001
17	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
18	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
19	Mũ	Cái	0,020
20	Khẩu trang	Cái	0,020
21	Găng tay	Đôi	3,000
22	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
23	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
24	Axit ngậm lam	ml	10,000
25	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
26	Bút viết kính	Cái	0,00
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Bật lửa	Cái	0,010
29	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
30	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
31	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
32	Khăn lau tay	Cái	0,030
33	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
34	QC (nếu thực hiện) *		0,1
35	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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: Máu, dịch, mủ, đờm, phân, nước tiểu, da, tóc, móng.

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 (Tham khảo phụ lục 5).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nuôi cấy nấm trên môi trường Sabouraud ủ ấm ở nhiệt độ 30°C.

- Bệnh phẩm là da, tóc, móng: Cắt nhỏ bệnh phẩm cấy 6- 8 điểm trên đĩa Sabouraud.
- Bệnh phẩm là các chất dịch: Hút 3- 5 giọt dịch cấy dàn trên đĩa Sabouraud.

- Bệnh phẩm là nước tiểu: Sử dụng kỹ thuật cấy định lượng.

2.2. Soi tươi tìm nấm: Đánh giá sơ bộ.

2.3. Đọc kết quả hàng ngày

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Quan sát hình thể cấu tạo, tính chất, màu sắc khuẩn lạc.

+ Khuẩn lạc nấm men:

Khuẩn lạc *Candida* có dạng trơn, nhẵn màu kem thường mọc nhanh sau 24 giờ.

Khuẩn lạc *Cryptococcus* trơn nhẵn màu be (khô hơn so với nấm *Candida*) mọc chậm thường sau 48 giờ.

+ Khuẩn lạc nấm mốc:

Aspergillus màu sắc khuẩn lạc khác nhau.

P. marneffei: sinh sắc tố màu đỏ nâu đến đỏ rượu vang khuếch tán vào môi trường khi nuôi cấy ở nhiệt độ phòng.

- Quan sát kính hiển vi sau cấy:

Tế bào nấm men hình tròn hoặc bầu dục (đối với nấm *Candida*), nảy chồi hoặc không. *Cryptococcus* thường hình tròn, kích thước lớn.

- Định danh loài nấm men

+ Định danh sơ bộ 4 loài nấm men tiến hành nuôi cấy vào môi trường *Candida select*.

+ Định danh nấm men bằng bộ API 20C AUX.

Trả kết quả loài nấm theo kết quả định danh.

- Định danh nấm mốc

Làm tiêu bản bằng Lactophenol Cotton Blue.

Dựa vào hình thái, màu sắc khuẩn lạc, dựa vào đặc điểm vi thể của từng loài *Aspergillus* để kết luận loài.

P. marneffei : Trên môi trường Sabouraud khuẩn lạc mọc nhanh, kiểu da lộn cho đến có dạng phủ đầy lông tơ, sinh sắc tố màu đỏ nâu đến đỏ rượu vang khuếch tán vào môi trường.

- Âm tính: Không thấy khuẩn lạc mọc sau 4 ngày trả kết quả sơ bộ: Âm tính.

- Các đĩa cấy được bỏ sau 7 ngày nuôi cấy.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Để định danh nấm men bằng bộ API 20C AUX cho kết quả chính xác khi lấy khuẩn lạc nấm phải thuần (khuẩn lạc riêng rẽ) tránh bị lẫn.

218. Vi nấm nuôi cấy và định danh hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Định danh vi nấm gây bệnh

2. Nguyên lý

Định danh vi nấm gây bệnh dựa vào phương pháp đo màu để nhận biết các tính chất sinh vật hóa học của vi nấm thông qua sự đổi màu các giếng môi trường có sẵn trong Card.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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 ly tâm
- Tủ ẩm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy định danh VITEK 2 - COMPACT và hệ thống máy tính, máy in, lưu điện
- Máy đo độ đục.
- Dispencer (Dụng cụ bơm nước muối 0,45%)
- Pipet loại 200µl và 1000µl
- Cassette có dán mã.
- Ống tube định danh 5ml

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.	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2.	Que cấy	Cái	2,000
3.	Lam kính	Cái	1,000
4.	Bông	Kg	0,001
5.	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000

6.	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7.	Thuốc nhuộm Fucsin	ml	5,000
8.	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
9.	Cồn 96 độ	ml	5,000
10.	Lugol	ml	5,000
11.	Thuốc nhuộm Xanh Methylen	ml	5,000
12.	Sabouraud	Đĩa	1,000
13.	Đầu côn 200 μ l	cái	1,000
14.	Đầu côn 1000 μ l	cái	1,000
15.	Đèn côn	cái	0,001
16.	Nước muối 0.45%	ml	0,003
17.	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
18.	Card định danh nấm	Cái	1,000
19.	Axit ngậm lam	ml	10,000
20.	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
21.	Mũ	Cái	0,020
22.	Khẩu trang	Cái	0,020
23.	Găng tay	Đôi	3,000
24.	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
25.	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
26.	Bút viết kính	Cái	0,020
27.	Bút bi	Cái	0,010
28.	Bật lửa	Cái	0,010
29.	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
30.	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
31.	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
32.	Khăn lau tay	Cái	0,010
33.	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
34.	QC (nếu thực hiện) *		0,1
35.	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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

Máu, dịch, mủ, đờm, phân, nước tiểu, da, tóc, móng.

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 5).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nuôi cấy nấm từ bệnh phẩm

+ Chuẩn bị bệnh phẩm, đĩa thạch sabouraud, đèn cồn và ống cấy.

+ Để đĩa thạch lấy từ tủ lạnh vào tủ ấm khoảng 10 - 15 phút trước khi cấy.

+ Cấy phân vùng từ bệnh phẩm vào đĩa thạch sabouraud theo quy trình

Chú ý: Các thao tác phải tiến hành nhanh chóng tránh bị nhiễm bẩn từ ngoài vào.

- Theo dõi nuôi cấy

+ Nếu trên đĩa sabouraud có khuẩn lạc nấm mọc, ta tiến hành làm tiêu bản soi trực tiếp bằng NaCl sinh lý xem để xác định nấm men hay nấm sợi.

+ Nếu trên đĩa thạch mọc nấm men lấy một khuẩn lạc nấm rìa riêng rẽ, để được chủng nấm thuần chạy Vitek định loại nấm.

2.2. Cách tiến hành chạy Vitek như sau

+ Chuẩn bị Worksheet cho cassette (Điền các thông tin cần biết về người bệnh như tên, lab ID...)

+ Chuẩn bị card: lấy card ra khỏi tủ lạnh và để ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút.

+ Chuẩn bị ống làm định danh với độ đục 2 McF

+ Cho cassette vào buồng hút và nhấn Start Fill

+ Khi đèn báo nháy, mở cửa buồng hút lấy cassette ra và mở cửa buồng vận hành rồi cho cassette vào. Đóng cả hai cửa và đợi.

+ Nhập thông tin cassette. Nhấn Save cassette data để xác nhận.

+ Nhập thông tin người bệnh. Nhấn save để xác nhận

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Nếu chủng nấm thuần máy Vitek sẽ cho ra kết quả một loại nấm

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Khi sử dụng card hết hạn máy sẽ báo lỗi, do đó phải kiểm tra hạn dùng của card trước khi tiến hành thí nghiệm

- Chủng nấm không thuần thì kết quả định danh cho nhiều đáp án, khi đó ta phải rìa lại riêng rẽ để được chủng nấm thuần.

219. Vi nấm nuôi cấy, định danh và kháng thuốc hệ thống tự động

I. MỤC ĐÍCH, NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Định danh vi nấm gây bệnh và xác định nồng độ ức chế tối thiểu của thuốc kháng nấm

2. Nguyên lý

Định danh vi nấm gây bệnh dựa vào phương pháp đo màu để nhận biết các tính chất sinh vật hóa học của vi nấm thông qua sự đổi màu các giếng môi trường có sẵn trong Card.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC của thuốc kháng nấm (cho các loại nấm men) bằng máy Vitek2 .

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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 ly tâm.
- Tủ ẩm thường.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy định danh VITEK 2 - COMPACT và hệ thống máy tính, máy in, lưu điện.
- Máy đo độ đục.
- Dispencer (Dụng cụ bơm nước muối 0,45%)
- Pipet loại 200µl và 1000µl.
- Cassette có dán mã.
- Ống tube định danh 5ml.

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
36.	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
37.	Que cấy	Cái	2,000
38.	Lam kính	Cái	2,000
39.	Lá kính	Cái	2,000
40.	Bông	Kg	0,001
41.	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
42.	Nước muối sinh lý	ml	5,000
43.	KOH 20 %	ml	5,000
44.	Mực tàu	ml	0,500
45.	Cồn 96 độ	ml	5,000
46.	Sabouraud	Đĩa	1,000
47.	Đầu côn 200µl	cái	1,000
48.	Đầu côn 1000µl	cái	1,000
49.	Đèn côn	cái	0,001
50.	Nước muối 0.45%	ml	0,003
51.	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
52.	Card định danh nấm	Cái	1,000
53.	Card kháng sinh đồ nấm	Cái	1,00
54.	Axit ngậm lam	ml	10,000
55.	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
56.	Mũ	Cái	0,020
57.	Khẩu trang	Cái	0,020
58.	Găng tay	Đôi	3,000
59.	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
60.	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
61.	Bút viết kính	Cái	0,020
62.	Bút bi	Cái	0,010
63.	Bật lửa	Cái	0,010
64.	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
65.	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
66.	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
67.	Khăn lau tay	Cái	0,010
68.	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Máu, dịch, mủ, đờm, phân, nước tiểu, da, tóc, móng.

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(Tham khảo phụ lục 3).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nuôi cấy nấm từ bệnh phẩm

Nuôi cấy nấm trên môi trường Sabouraud ủ ấm ở nhiệt độ 30°C.

Theo dõi nuôi cấy:

+ Nếu trên đĩa sabouraud có khuẩn lạc nấm mọc, tiến hành làm tiêu bản soi trực tiếp bằng NaCl sinh lý để xác định nấm men hay nấm sợi.

+ Nếu trên đĩa thạch mọc nấm men lấy một vài khuẩn lạc nấm ria riêng rẽ, để được chủng nấm thuần chạy Vitek định danh và làm kháng sinh đồ nấm.

2.2. Cách tiến hành chạy Vitek

- Chuẩn bị Worksheet cho cassette (Điền các thông tin cần biết về người bệnh như tên, lab ID...)

- Chuẩn bị card định danh và card kháng sinh đồ.

- Chuẩn bị ống làm định danh với độ đục 1,8 – 2,2 McF.

- Chuẩn bị ống làm kháng sinh đồ: lấy 3ml saline vào ống nghiệm mới và đặt vào cassette. Dùng pipette hút 280 µl từ ống nghiệm làm định danh sang ống nghiệm làm kháng sinh đồ.

- Cho cassette vào buồng hút và nhấn Start Fill

- Khi đèn báo nháy, mở cửa buồng hút lấy cassette ra và mở cửa buồng vận hành rồi cho cassette vào. Đóng cả hai cửa và đợi.

- Nhập thông tin cassette. Nhấn Save cassette data để xác nhận.

- Nhập thông tin người bệnh. Nhấn save để xác nhận

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Nếu chủng nấm thuần máy Vitek sẽ cho ra kết quả một loại nấm và kết quả kháng sinh đồ MIC cho 4 loại thuốc kháng nấm: Flucytosine, Fluconazole, Voriconazole, Amphotericin B.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Khi sử dụng card hết hạn máy sẽ báo lỗi, do đó phải kiểm tra hạn dùng của card trước khi tiến hành thí nghiệm.

Chủng nấm không thuần thì kết quả định danh cho nhiều đáp án, khi đó ta phải ria lại riêng rẽ để được chủng nấm thuần.

220. Vi nấm khẳng định (tham chiếu)

I. MỤC ĐÍCH, NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định vi nấm gây bệnh

2. Nguyên lý

Nuôi cấy, định danh vi nấm dựa trên các tính chất về hình thể, cấu tạo, bắt màu và một số tính chất sinh vật, hóa học của nấm.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Kính hiển vi.
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm.
- Tủ ẩm.
- Máy tính cài phần mềm đọc API(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	SỐ LƯỢNG
1	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Lá kính	Cái	2,000
5	Lactophenol Coton Blue	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	KOH 20 %	ml	5,000
8	Mực tàu	ml	0,500
9	Sabouraud	Đĩa	1,000
10	Candiselect	Đĩa	0,500
11	Giá đường API 20C AUX	Test	1,000
12	RAT	Ống	1,000

13	Bông	Kg	0,001
14	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
15	Đèn cồn	Cái	0,0001
16	Panh	Cái	0,0001
17	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
18	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
19	Mũ	Cái	0,020
20	Khẩu trang	Cái	0,020
21	Găng tay	Đôi	3,000
22	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
23	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
24	Axit ngậm lam	ml	10,000
25	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
26	Bút viết kính	Cái	0,00
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Bật lửa	Cái	0,010
29	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
30	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
31	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
32	Khăn lau tay	Cái	0,030
33	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000

3. Bệnh phẩm

Máu, dịch, mủ, đờm, phân, nước tiểu, da, tóc, móng.

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(Tham khảo phụ lục 5).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Nuôi cấy nấm trên môi trường Sabouraud ủ ấm ở nhiệt độ 30°C.

- Bệnh phẩm là da, tóc, móng: Cắt nhỏ bệnh phẩm cấy 6- 8 điểm trên đĩa Sabouraud.
- Bệnh phẩm là các chất dịch: Hút 3- 5 giọt dịch cấy dàn trên đĩa Sabouraud.
- Bệnh phẩm là nước tiểu: Sử dụng kỹ thuật cấy định lượng.

2.2. Soi tươi tìm nấm: Đánh giá sơ bộ.

2.3. Đọc kết quả hàng ngày.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Quan sát hình thể cấu tạo, tính chất, màu sắc khuẩn lạc.
- + Khuẩn lạc nấm men

Khuẩn lạc *Candida* có dạng tròn, nhẵn màu kem thường mọc nhanh sau 24giờ.

Khuẩn lạc *Cryptococcus* tròn nhẵn màu be(khô hơn so với nấm *Candida*) mọc chậm thường sau 48giờ.

- + Khuẩn lạc nấm mốc:

Aspergillus màu sắc khuẩn lạc khác nhau.

P. marneffei : sinh sắc tố màu đỏ nâu đến đỏ rượu vang khuếch tán vào môi trường khi nuôi cấy ở nhiệt độ phòng.

- Quan sát kính hiển vi sau cấy:

Tế bào nấm men hình tròn hoặc bầu dục (đối với nấm *Candida*), nảy chồi hoặc không. *Cryptococcus* thường hình tròn, kích thước lớn.

- Định danh loài nấm men:

- + Định danh sơ bộ 4 loài nấm men tiến hành nuôi cấy vào môi trường *Candida select*.

- + Định danh nấm men bằng bộ API 20C AUX.

Trả kết quả loài nấm theo kết quả định danh.

- Định danh nấm mốc:

Làm tiêu bản bằng Lactophenol Coton Blue.

Dựa vào hình thái, màu sắc khuẩn lạc, dựa vào đặc điểm vi thể của từng loài *Aspergillus* để kết luận loài.

P. marneffei : Trên môi trường Sabouraud khuẩn lạc mọc nhanh, kiểu da lộn cho đến có dạng phủ đầy lông tơ, sinh sắc tố màu đỏ nâu đến đỏ rượu vang khuếch tán vào môi trường.

- Âm tính: Không thấy khuẩn lạc mọc sau 4 ngày trả kết quả sơ bộ : Âm tính.
- Các đĩa cấy được bỏ sau 7 ngày nuôi cấy.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Để định danh nấm men bằng bộ API 20C AUX cho kết quả chính xác khi lấy khuẩn lạc nấm phải thuần(khuẩn lạc riêng rẽ) tránh bị lẫn .

221. Vi nấm kháng thuốc định lượng (MIC) (Cho 1 loại kháng sinh)

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC của thuốc kháng nấm

2. Nguyên lý

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC của thuốc kháng nấm (cho các loại nấm men) bằng máy làm kháng sinh đồ tự động Vitek2

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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 ly tâm
- Tủ ẩm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy định danh VITEK 2 - COMPACT và hệ thống máy tính, máy in, lưu điện
- Máy đo độ đục.
- Dispencer (Dụng cụ bơm nước muối 0,45%)
- Pipet loại 200 μ l và 1000 μ l
- Cassette có dán mã.
- Ống tube định danh 5ml

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	1,000
4	Bông	Kg	0,001
5	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000

7	Thuốc nhuộm Fucsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
9	Cồn 96 độ	ml	5,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Sabouraud	Đĩa	1,000
12	Đầu côn 200 μ l	cái	1,000
13	Đầu côn 1000 μ l	cái	1,000
14	Đèn cồn	cái	0,001
15	Nước muối 0.45%	ml	0,003
16	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	1,000
17	Card kháng sinh đồ cho nấm	Cái	1,000
18	Axit ngậm lam	ml	10,000
19	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
20	Mũ	Cái	0,020
21	Khẩu trang	Cái	0,020
22	Găng tay	Đôi	3,000
23	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
24	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,001
25	Bút viết kính	Cái	0,020
26	Bút bi	Cái	0,010
27	Bật lửa	Cái	0,010
28	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Quyển	0,001
29	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
30	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
31	Khăn lau tay	Cái	0,010
32	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
33	QC (nếu thực hiện) *		0,1
34	EQAS (nếu thực hiện) *		0,005

* 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/chủng nấm

Chủng nấm đã được phân lập

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 Ký sinh trùng(Xem Phụ lục 4).

2.Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị chủng nấm đã được phân lập, nuôi cấy đúng thời gian
- Chuẩn bị Worksheet cho cassette
- Chuẩn bị card: lấy card ra khỏi tủ lạnh và để ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút.
- Chuẩn bị ống như làm định danh với độ đục 2 McF.
- Chuẩn bị ống làm kháng sinh đồ: lấy 3ml saline vào ống nghiệm mới và đặt vào cassette. Dùng pipette hút 280 µl từ ống nghiệm làm định danh sang ống nghiệm làm kháng sinh đồ. Cho cassette vào buồng hút và nhấn Start Fill
- Mở cửa buồng hút lấy cassette ra và mở cửa buồng vận hành rồi cho cassette vào. Đóng cả hai cửa và đợi.
- Nhập thông tin cassette. Save cassette data để xác nhận.
- Nhập thông tin người bệnh. Nhấn save để xác nhận

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Nếu chủng nấm thuần máy Vitek sẽ cho ra kết quả kháng sinh đồ MIC cho 4 loại thuốc kháng nấm:Flucytosine, Fluconazole, Voriconazole, Amphotericin.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Khi sử dụng card hết hạn máy sẽ báo lỗi , do đó phải kiểm tra hạn dùng của card trước khi tiến hành thí nghiệm
- Chủng nấm không thuần hoặc định danh không đúng chủng nấm thì kết quả sẽ không chính xác, khi đó ta phải rĩa lại riêng rẽ để được chủng nấm thuần

222. Vi nấm PCR

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Định danh vi nấm

2. Nguyên lý

Định danh vi nấm sử dụng cặp mồi đặc hiệu để xác định sự có mặt của gen đặc trưng cho vi nấm bằng kỹ thuật PCR

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy PCR
- Máy điện di
- Máy đọc điện di
- Máy ly tâm 16000 vòng/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	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500

9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết ADN từ nấm	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1	ml	0,0001
14	Primer 2	ml	0,0001
15	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
16	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
17	Đầu côn 10 ul có lọc	Cái	1,000
18	Đầu côn 30 ul	Cái	1,200
19	Đầu côn 200 ul có lọc	Cái	2,200
20	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
21	Ethanol BDH	ml	0,500
22	Water-DEPC Treated	ml	2,000
23	Giấy thấm	Cuộn	0,100
24	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
25	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
26	Bút viết kính	Cái	0,020
27	Bút bi	Cái	0,010
28	Mũ	Cái	0,020
29	Khẩu trang	Cái	0,020
30	Găng tay	Đôi	0,100
31	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
32	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
33	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
36	Khăn lau tay	cái	0,010

3. Bệnh phẩm

Chủng nấm đã được nuôi cấy thuần

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 5).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết ADN tổng số

2.2. Thực hiện PCR

2.3. Điện di kiểm tra sản phẩm

2.4. Đánh giá 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 và có kích thước tương ứng với thang ADN chuẩn.

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.

223. Vi nấm giải trình tự gene

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Định danh vi nấm

2. Nguyên lý

Định danh vi nấm bằng kỹ thuật xác định trình tự nucleotide của gen đặc trưng

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: Cán bộ có trình độ đại học hoặc sau đại học 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

- Tủ an toàn Sinh học cấp 2
- Máy PCR
- Máy đọc điện di
- Máy giải trình tự gen
- Máy ly tâm 16000 vòng/phút
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- 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	Số lượng
1	Bông	kg	0,001
2	Cồn	ml	1,000
3	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
4	Panh	Cái	0,0001
5	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
6	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Test	0,001
7	Tube đựng bệnh phẩm	Cái	2,000
8	Găng không có bột (DNase-RNase free)	Cái	0,500

9	Sinh phẩm chẩn đoán	Test	1,000
10	Khẩu hao sinh phẩm cho kiểm tra lại	Test	1,350
11	Kit tách chiết ADN	Test	2,350
12	DNA marker	Bộ	1,000
13	Primer 1 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
14	Primer 2 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
15	Primer 3 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
16	Primer 4 (primer đặc hiệu)	ml	0,0001
17	Ống Eppendorf 1,5 ml	Tube	3,000
18	Ống Eppendorf 0,2 ml	Tube	1,000
19	Đầu côn 10 ul có lọc	Cái	1,000
20	Đầu côn 30 ul	Cái	1,200
21	Đầu côn 200 ul có lọc	Cái	2,200
22	Đầu côn 1 ml có lọc	Cái	3,200
23	Ethanol BDH	ml	0,500
24	Water-DEPC Treated	ml	2,000
25	Giấy thấm	Cuộn	0,100
26	Giấy xét nghiệm	Tờ	2,000
27	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
28	Bút viết kính	Cái	0,020
29	Bút bi	Cái	0,010
30	Mũ	Cái	0,020
31	Khẩu trang	Cái	0,020
32	Găng tay	Đôi	0,100
33	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,020
34	Quần áo bảo hộ	Bộ	0,005
35	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
36	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
37	Dung dịch khử trùng	ml	10,000
38	Khăn lau tay	cái	0,010

3. Bệnh phẩm

Chủng nấm đã được nuôi cấy thuần.

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 5).

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Tách chiết DNA 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 của nấm trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế

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 loại nấm.

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.

224. Vi sinh vật cấy kiểm tra không khí

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

- Đánh giá sự hiện diện của các vi sinh vật trong không khí về số lượng và chất lượng.
- Phát hiện nguồn nhiễm vi sinh vật gây nhiễm trùng bệnh viện có trong không khí.

2. Nguyên lý

Vi sinh vật được đánh giá về số lượng và chất lượng bằng phương pháp nuôi cấy kính điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Máy tính cài phần mềm đọc API (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	Số lượng
1	Lam kính	Cái	2,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Dầu soi kính	ml	1,000
4	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
5	Nước muối sinh lý	ml	5,000
6	Thuốc nhuộm đỏ Fucsin	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000

8	Cồn tẩy 96 độ	ml	10,000
9	Lugol	ml	5,000
10	Thuốc nhuộm Xanh Methylen	ml	5,000
11	Môi trường thạch máu thường	Đĩa	5,000
12	Môi trường Sabouraud	Đĩa	5,000
13	Giá đường API	Test	1,000
14	Bông	Kg	0,001
15	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
16	Đèn cồn	Cái	0,0001
17	Panh	Cái	0,0001
18	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
19	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
20	Mũ	Cái	0,02
21	Khẩu trang	Cái	0,02
22	Găng tay	Đôi	3,000
23	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,02
24	Quần áo	Bộ	0,001
25	Axits ngâm lam	ml	10,000
26	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
27	Bút viết kính	Cái	0,02
28	Bút bi	Cái	0,01
29	Bật lửa	Cái	0,01
30	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
31	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
32	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
33	Khăn lau tay	Cái	0,03
34	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
35	QC		0,1
36	EQAS		0,005

Môi trường nuôi cấy và hóa chất định danh vi khuẩn được tính trên tỉ lệ dương tính trung bình là 50 % cho các loại bệnh phẩm.

* 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

- Không khí phòng mổ trước mổ, phòng vô trùng.
- Không khí phòng vô trùng.

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.

Phương pháp lắng bụi trực tiếp của Koch

1. Thời điểm lấy mẫu

- Đối với phòng mổ mẫu không khí được lấy vào thời điểm trước khi mổ vào đầu buổi sang.
- Các mẫu không khí sẽ được lấy trong điều kiện hệ thống thông gió đang hoạt động bình thường.

2. Phương pháp lấy mẫu

Lấy mẫu tại 5 điểm: 1 ở giữa phòng và 4 ở góc phòng. Mỗi nơi đặt 1 đĩa thạch máu và 1 đĩa Sabauround đã được kiểm tra độ vô khuẩn. Đặt cách nền nhà 1m. Mở nắp đĩa 10 phút, sau đó đậy nắp đĩa.

3. Nuôi cấy và ủ ấm

- Thạch máu: 35-37 °C, 24-48 tiếng, khí trường thông thường.
- Thạch Sabauround: 22-25 °C, 7-10 ngày, khí trường thông thường

4. Đọc kết quả

Đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch.

Đo đường kính của đĩa petri.

Đếm số lượng khuẩn lạc trên mỗi đĩa thạch. Tổng số VK/1m³ không khí được tính theo công thức của Omelanski V:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100}{S \times k}$$

X: Tổng số vi khuẩn/m³ không khí

A: Số lượng vi khuẩn

S: Diện tích đĩa petri

k: Hệ số tính theo thời gian đặt hộp thạch (k = 2 nếu đặt 10 phút)

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Hiện nay chưa có một tiêu chuẩn qui định về số lượng VSV không khí của phòng mổ, phòng bệnh, phòng pha chế, cơ sở sản xuất. Tuy nhiên có thể khẳng định được rằng về nguyên tắc các phòng mổ trước mổ hoặc các phòng đòi hỏi vô khuẩn cao nhất thiết không còn sự hiện diện của bất cứ loài vi sinh vật nào. Tham khảo tiêu chuẩn đánh giá không khí phòng mổ, phòng vô trùng của CDC:

Đánh giá không khí sạch về số lượng:

- + Không khí rất sạch có dưới 500 VSV/1m³ không khí.
- + Không khí sạch có từ 500 - 1.000 VSV/1m³ không khí.
- + Không khí tương đối sạch có từ 1.000 - 2.000 VSV/1m³ không khí.
- + Không khí bẩn có trên 2.000 VSV/1m³ không khí.
- + Đánh giá không khí sạch về chất lượng:
- + Không có tụ cầu, liên cầu, nấm gây bệnh.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Mẫu không khí lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

Nếu kết quả cho thấy số lượng hoặc chất lượng vi sinh vật có trong không khí vượt quá tiêu chuẩn cho phép thì cần áp dụng các biện pháp can thiệp như làm sạch và khử trùng nền, tường, trần nhà, máy móc, trang thiết bị trong phòng...

225. Vi sinh vật cây kiểm tra bàn tay

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Đánh giá sự hiện diện của các vi sinh vật trên bàn tay phẫu thuật viên sau khi rửa tay ngoại khoa.

2. Nguyên lý

Vi sinh vật được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Máy tính cài phần mềm đọc API (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	Số lượng
1	Lam kính	Cái	2,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Dầu soi kính	ml	1,000
4	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
5	Nước muối sinh lý	ml	5,000
6	Thuốc nhuộm đỏ Fucsin	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
8	Cồn tẩy 96 độ	ml	10,000
9	Lugol	ml	5,000
10	Thuốc nhuộm Xanh Methylen	ml	5,000

11	Canh thang hiệu khí 5 ml	ống	1,000
12	Canh thang yếm khí 5 ml	ống	1,000
13	Môi trường thạch máu thường	Đĩa	1,000
14	Môi trường Uri Select 4	Đĩa	1,000
15	Panel định danh (ống Broth AST, ID, dd Indicator)	Test	1,000
16	Panel chứng	Bộ	0,0002
17	Bông	Kg	0,001
18	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
19	Đèn cồn	Cái	0,0001
20	Panh	Cái	0,0001
21	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
22	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
23	Mũ	Cái	0,02
24	Khẩu trang	Cái	0,02
25	Găng tay	Đôi	3,000
26	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,02
27	Quần áo	Bộ	0,001
28	Axits ngâm lam	ml	10,000
29	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
30	Bút viết kính	Cái	0,02
31	Bút bi	Cái	0,01
32	Bật lửa	Cái	0,01
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
36	Khăn lau tay	Cái	0,03
37	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
38	QC		0,1
39	EQAS		0,005

Môi trường nuôi cấy và hóa chất định danh vi khuẩn được tính trên tỉ lệ dương tính trung bình là 50 % cho các loại bệnh phẩm.

* 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

Mẫu tay phẫu thuật viên sau rửa tay ngoại khoa, trước mổ.

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

Dùng 2 tấm bông vô khuẩn đã được làm ướt bằng nước muối sinh lý 0,9% quét mạnh vào các vị trí đầu ngón trỏ, kẽ ngón trỏ và ngón giữa, lòng bàn tay. Cho 1 tấm bông vào ống canh thang thường và 1 tấm bông vào ống canh thang yếm khí, hơ qua ngọn lửa đèn cồn. Đậy nút ống.

2. Tiến hành kỹ thuật

- Nuôi cấy và ủ ấm ống canh thang ở 35- 37⁰ C, 16-18 tiếng, khí trường thường.
- Đánh giá độ đục của canh thang.
- Nếu canh thang đục thì nhuộm Gram để nhận định hình thể từng loại vi khuẩn.
- Định danh từng loại vi khuẩn dựa vào các tính chất sinh hóa vật học.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dương tính: Có vi sinh vật trên bàn tay phẫu thuật viên. Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi sinh vật.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Lưu ý lấy mẫu cần tiến hành càng nhanh càng tốt để hạn chế tối đa sự ô nhiễm từ môi trường không khí. Mẫu bàn tay lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

Nếu kết quả xét nghiệm dương tính thì xem xét chất lượng nước rửa tay, quy trình rửa tay, khăn lau tay... để đưa ra những khuyến cáo thích hợp.

226. Vi sinh vật cây kiểm tra dụng cụ đã tiệt trùng

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện các vi sinh vật trên dụng cụ y tế đã tiệt trùng còn thời hạn sử dụng để đánh giá quá trình tiệt trùng.

2. Nguyên lý

Vi sinh vật được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Máy tính cài phần mềm đọc API (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	Số lượng
1	Lam kính	Cái	2,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Dầu soi kính	ml	1,000
4	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
5	Nước muối sinh lý	ml	5,000
6	Thuốc nhuộm đỏ Fucsin	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
8	Cồn tẩy 96 độ	ml	10,000
9	Lugol	ml	5,000
10	Thuốc nhuộm Xanh Methylen	ml	5,000

11	Canh thang hiệu khí 5 ml	ống	1,000
12	Canh thang yếm khí 5 ml	ống	1,000
13	Môi trường thạch máu thường	Đĩa	1,000
14	Môi trường Uri Select 4	Đĩa	1,000
15	Panel định danh (ống Broth AST, ID, dd Indicator)	Test	1,000
16	Panel chứng	Bộ	0,0002
17	Bông	Kg	0,001
18	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
19	Đèn cồn	Cái	0,0001
20	Panh	Cái	0,0001
21	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
22	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
23	Mũ	Cái	0,02
24	Khẩu trang	Cái	0,02
25	Găng tay	Đôi	3,000
26	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,02
27	Quần áo	Bộ	0,001
28	Axits ngâm lam	ml	10,000
29	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
30	Bút viết kính	Cái	0,02
31	Bút bi	Cái	0,01
32	Bật lửa	Cái	0,01
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch nước rửa tay	ml	8
36	Khăn lau tay	Cái	0,03
37	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
38	QC		0,1
39	EQAS		0,005

Môi trường nuôi cấy và hóa chất định danh vi khuẩn được tính trên tỉ lệ dương tính trung bình là 50 % cho các loại bệnh phẩm.

* 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

Mẫu dụng cụ y tế đã tiết trùng còn thời hạn sử dụng.

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

Dùng 2 que tăm bông vô khuẩn đã được làm ướt bằng nước muối sinh lý 0,9% quệt mạnh như nhau vào mỗi dụng cụ cần kiểm tra và trong thời gian 10 giây. Cho 1 tăm bông vào ống canh thang thường và 1 tăm bông vào ống canh thang yếm khí, hơ qua ngọn lửa đèn cồn. Đậy nút ống.

2. Tiến hành kỹ thuật

- Nuôi cấy và ủ ấm ống canh thang ở 35- 37⁰ C, 16-18 tiếng, khí trường thường.
- Đánh giá độ đục của canh thang.
- Nếu canh thang đục thì nhuộm Gram để nhận định hình thể từng loại vi khuẩn.
- Định danh từng loại vi khuẩn dựa vào các tính chất sinh vật hóa học.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dương tính: Có vi sinh vật trên dụng cụ y tế. Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi sinh vật.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Lưu ý lấy mẫu cần tiến hành càng nhanh càng tốt để hạn chế tối đa sự ô nhiễm từ môi trường không khí. Mẫu dụng cụ y tế lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng qui định có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

Nếu kết quả xét nghiệm dương tính thì xem xét các bước khử trùng, tiệt trùng và bảo quản dụng cụ y tế đã tiệt trùng còn thời hạn sử dụng để đưa ra những khuyến cáo thích hợp.

227. Vi sinh vật cấy kiểm tra bề mặt

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Đánh giá sự hiện diện của các vi sinh vật trên các bề mặt chăm sóc y tế.

2. Nguyên lý

Vi sinh vật được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Máy tính cài phần mềm đọc API (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	Số lượng
1	Lam kính	Cái	2,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Dầu soi kính	ml	1,000
4	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
5	Nước muối sinh lý	ml	5,000
6	Thuốc nhuộm đỏ Fucsin	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
8	Cồn tẩy 96 độ	ml	10,000
9	Lugol	ml	5,000
10	Thuốc nhuộm Xanh Methylen	ml	5,000
11	Canh thang hiệu khí 5 ml	ống	1,000

12	Canh thang yếm khí 5 ml	ống	1,000
13	Môi trường thạch máu thường	Đĩa	1,000
14	Môi trường Uri Select 4	Đĩa	1,000
15	Panel định danh (ống Broth AST, ID, dd Indicator)	Test	1,000
16	Panel chứng	Bộ	0,0002
17	Bông	Kg	0,001
18	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
19	Đèn cồn	Cái	0,0001
20	Panh	Cái	0,0001
21	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
22	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
23	Mũ	Cái	0,02
24	Khẩu trang	Cái	0,02
25	Găng tay	Đôi	3,000
26	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,02
27	Quần áo	Bộ	0,001
28	Axits ngâm lam	ml	10,000
29	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
30	Bút viết kính	Cái	0,02
31	Bút bi	Cái	0,01
32	Bật lửa	Cái	0,01
33	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
34	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
35	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
36	Khăn lau tay	Cái	0,03
37	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
38	QC		0,1
39	EQAS		0,005

Môi trường nuôi cấy và hóa chất định danh vi khuẩn được tính trên tỉ lệ dương tính trung bình là 50 % cho các loại bệnh phẩm.

* 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

Mẫu các bề mặt chăm sóc y tế.

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

Dùng 2 que tăm bông vô khuẩn đã được làm ướt bằng nước muối sinh lý 0,9% quệt mạnh như nhau vào mỗi bề mặt cần kiểm tra và trong thời gian 10 giây. Cho 1 tăm bông vào ống canh thang thường và 1 tăm bông vào ống canh thang yếm khí, hơ qua ngọn lửa đèn cồn. Đậy nút ống.

2. Tiến hành kỹ thuật

- Nuôi cấy và ủ ấm ống canh thang ở 35- 37⁰ C, 16-18 tiếng, khí trường thường.
- Đánh giá độ đục của canh thang.
- Nếu canh thang đục thì nhuộm Gram để nhận định hình thể từng loại vi khuẩn.
- Định danh từng loại vi khuẩn dựa vào các tính chất sinh vật hóa học.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dương tính: Có vi sinh vật trên bề mặt. Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi sinh vật.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Lưu ý lấy mẫu cần tiến hành càng nhanh càng tốt để hạn chế tối đa sự ô nhiễm từ môi trường không khí. Mẫu bề mặt lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng quy định có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả.

Nếu kết quả xét nghiệm dương tính thì xem xét quy trình khử trùng bề mặt, chất lượng nước sát trùng... để đưa ra những khuyến cáo thích hợp.

228. Vi sinh vật cấy kiểm tra nước sinh hoạt

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

- Đánh giá số lượng coliform.
- Phát hiện vi sinh vật gây hoặc có khả năng gây nhiễm trùng bệnh viện.

2. Nguyên lý

Vi sinh vật được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Máy tính cài phần mềm đọc API (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	Số lượng
1	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm đỏ Fucsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 96 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Thuốc nhuộm Xanh Methylen	ml	5,000

12	Canh thang Lactose đặc 10 ml	ống	5,000
13	Canh thang Lactose loãng 5 ml	ống	2,000
14	Môi trường thạch máu thường	Đĩa	1,000
15	Môi trường Uri select 4	Đĩa	1,000
16	Panel định danh (ống Broth AST, ID, dd Indicator)	Test	1,000
17	Panel chứng	Bộ	0,0002
18	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
19	Bông	Kg	0,001
20	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
21	Đèn cồn	Cái	0,0001
22	Panh	Cái	0,0001
23	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
24	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
25	Mũ	Cái	0,02
26	Khẩu trang	Cái	0,02
27	Găng tay	Đôi	3,000
28	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,02
29	Quần áo	Bộ	0,001
30	Axits ngâm lam	ml	10,000
31	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
32	Bút viết kính	Cái	0,02
33	Bút bi	Cái	0,01
34	Bật lửa	Cái	0,01
35	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
36	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
37	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
38	Khăn lau tay	Cái	0,03
39	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
40	QC		0,1
41	EQAS		0,005

Môi trường nuôi cấy và hóa chất định danh vi khuẩn được tính trên tỉ lệ dương tính trung bình là 50 % cho các loại bệnh phẩm.

* 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

- Nước vô trùng rửa tay phẫu thuật, thủ thuật
- Nước sinh hoạt tại cơ sở y tế.

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

- Chọn địa điểm, số lượng và thời gian lấy mẫu có thể đánh giá chất lượng vi khuẩn toàn bộ hệ thống cung cấp nước từ đầu nguồn, giữa nguồn và cuối nguồn.

- Mở nước chảy hết cỡ 2-3 phút. Đóng vòi và khử khuẩn kỹ vòi bằng nhiệt độ bùng cồn. Mở lại cho chảy mạnh 2-3 phút rồi điều chỉnh chảy vừa đủ để lấy mẫu, tránh không gây bắn ra ngoài. Dùng chai thủy tinh, nút mài vô khuẩn lấy 100 ml cho mục đích kiểm tra chất lượng về vi khuẩn học, 1000ml cho phân tích vi khuẩn gây bệnh. Lấy xong đốt miệng lọ để sát khuẩn và đậy kín ống nghiệm.

2. Tiến hành kỹ thuật

2.1. Định lượng coliform bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN: Most probable number)

- Phương pháp cấy 7 ống:

+ 05 ống canh thang lactose đặc, mỗi ống cấy 10ml nước mẫu ở đậm độ nguyên chất.

+ 01 ống canh thang lactose loãng, cấy 1 ml nước nguyên chất.

+ 01 ống canh thang lactose loãng cấy 1ml nước ở đậm độ 10^{-1} hoặc 0,1 ml nước mẫu.

+ Hàng thứ 4, 5,... tiếp tục cấy đến đậm độ cần thiết.

- Nuôi cấy và ủ ấm: Ủ ấm $35-37^{\circ}\text{C}$ trong vòng 48 giờ ± 3 , khí trường thường.

- Đọc kết quả: Những ống lên men lactose sinh acid, chuyển màu môi trường xanh sang vàng và sinh hơi trong ống sinh hơi được coi là dương tính (+). Ghi tất cả những ống (+) theo các đậm độ cấy:

+ 05 ống canh thang lactose đặc, cấy 10ml (+) ghi 5

+ 01 ống canh thang lactose loãng (+) ghi 1

+ 01 ống canh thang lactose loãng (+) ghi 1

Xác định dãy số phương pháp 7 ống là: 5 1 1

2.2. Phát hiện vi sinh vật gây bệnh:

- Nuôi cấy và ủ ấm canh thang ở $35-37^{\circ}\text{C}$ trong vòng 48 giờ ± 3 , khí trường thường.

- Đánh giá độ đục của canh thang.
- Nếu canh thang đục thì nhuộm Gram để nhận định hình thể từng loại vi khuẩn.
- Định danh từng loại vi khuẩn dựa vào các tính chất sinh vật hóa học.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Định lượng Coliform

Chọn các ống lên men lactose và sinh hơi trong canh thang để xác định được các dãy số. Tra bảng MPN cho phương pháp cấy 7 ống để tính số lượng vi khuẩn/100 ml nước.

2. Phát hiện vi sinh vật gây bệnh

- Dương tính: Có vi sinh vật gây bệnh trong nước sinh hoạt. Phân lập và định danh được vi khuẩn gây bệnh. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi sinh vật.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Coliform là trực khuẩn Gram âm, hiếu khí, kỵ khí tùy tiện, không nha bào, có khả năng lên men lactose sinh acid, sinh hơi ở 35- 37⁰C trong vòng 48 giờ. Chúng được tìm thấy trong phân người, động vật và cả trong môi trường như đất, nước, rau quả... Coliform được coi là chỉ điểm vệ sinh quan trọng. Nồng độ coliform trong nước chứng minh rằng biện pháp khử khuẩn chưa đạt hiệu quả.

Khi xét nghiệm mẫu nước có vi khuẩn vượt quá tiêu chuẩn qui định cần áp dụng một số biện pháp can thiệp tạm thời cho đến khi nguồn nước được xử lý.

229. Vi sinh vật cấy kiểm tra nước thải

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Đánh giá số lượng coliform có trong nước thải sau xử lý tại cơ sở y tế.

2. Nguyên lý

Vi sinh vật được phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy kinh điển. Vi sinh vật được định danh dựa vào đặc điểm nuôi cấy, một số tính chất chuyển hóa, các đặc điểm về hình thái học và có thể kết hợp với tính chất kháng nguyên.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Máy tính cài phần mềm đọc API (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	Số lượng
1	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Cồn 96 độ lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm đỏ Fucsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 96 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000

11	Nước muối sinh lý 5ml	ống	9,000
12	Thuốc nhuộm Xanh Methylen	ml	5,000
13	Canh thang Lactose đặc 10 ml	ống	3,000
14	Canh thang Lactose loãng 5 ml	ống	24,000
15	Môi trường thạch máu thường	Đĩa	1,000
16	Môi trường Uri select 4	Đĩa	1,000
17	Panel định danh (ống Broth AST, ID, dd Indicator)	Test	1,000
18	Panel chứng	Bộ	0,0002
19	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
20	Bông	Kg	0,001
21	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
22	Đèn cồn	Cái	0,0001
23	Panh	Cái	0,0001
24	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
25	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
26	Mũ	Cái	0,02
27	Khẩu trang	Cái	0,02
28	Găng tay	Đôi	3,000
29	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,02
30	Quần áo	Bộ	0,001
31	Axits ngâm lam	ml	10,000
32	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
33	Bút viết kính	Cái	0,02
34	Bút bi	Cái	0,01
35	Bật lửa	Cái	0,01
36	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
37	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
38	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
39	Khăn lau tay	Cái	0,03
40	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
41	QC		0,1
42	EQAS		0,005

Môi trường nuôi cấy và hóa chất định danh vi khuẩn được tính trên tỉ lệ dương tính trung bình là 50 % cho các loại bệnh phẩm.

* 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

Nước thải sau xử lý tại cơ sở y tế.

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

- Chọn địa điểm, số lượng mẫu và thời gian lấy mẫu có thể đánh giá chất lượng vi khuẩn học toàn bộ nguồn nước thải bệnh viện. Thường lấy tại bể tập trung toàn bệnh viện để đánh giá ô nhiễm vi sinh từ đầu nguồn. Lấy mẫu sau từng giai đoạn xử lý và đầu ra sau xử lý. Vì lượng nước thải không đều, nên lấy mẫu vào nhiều thời điểm trong ngày rồi trộn các mẫu lại thành một mẫu gọi là mẫu trộn.

- Dùng quang chai đã khử khuẩn bằng nhiệt độ bùng còn. Dìm quang chai sâu cách mặt nước 30 cm, khi nước gần đầy chai thì kéo lên để lại trống chừng khoảng 2 - 3 cm từ mặt dưới nút chai trở xuống để tránh nhiễm khuẩn từ miệng nút chai và để khi phân tích lắc trộn mẫu được dễ dàng. Dùng chai thủy tinh, nút mài vô khuẩn lấy 100 ml cho mục đích kiểm tra chất lượng về vi khuẩn học, 1.000ml cho phân tích vi khuẩn gây bệnh. Lấy xong đốt miệng lọ để sát khuẩn và đậy kín ống nghiệm. Khử khuẩn tại miệng chai nút chai, đóng nút nhanh và bao lại miệng chai cẩn thận.

- Nếu không có quang chai, phải rửa tay xà phòng sạch sẽ, lau cồn khử khuẩn tay. Sau đó cầm gần đáy chai, dìm chai xuống nước, đặt chai nằm ngang hơi chúc đầu xuống độ sâu khoảng 15-20 cm để ngang chai tạo dòng nước tự chảy vào miệng chai, tránh lấy nước trên bề mặt. Các thao tác khác thực hiện như đã mô tả ở trên.

- Trường hợp không lấy được trực tiếp, phải dùng xô, gầu múc, cần đồ bỏ 3 lần, lần thứ tư mới rót nhẹ nhàng vào chai sao cho tay không làm nhiễm bẩn mẫu nước.

2. Tiến hành kỹ thuật định lượng coliform bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN: Most probable number):

Phương pháp cấy nhiều ống:

- Chuẩn bị: Có thể xếp 5 hàng, mỗi hàng 3 ống hoặc 5 ống, hàng đầu là những ống canh thang lactose đặc và 2 hàng sau là những ống canh thang lactose loãng.

- Pha loãng: hút vô khuẩn 1ml mẫu nước nguyên cho vào nước muối sinh lý 0,85% chứa 9 ml để có đậm độ pha loãng 10^{-1} . Hút trộn lên xuống 20 - 25 lần để trộn đều mẫu với nước muối. Từ đậm độ này, lại hút 1ml chuyển sang ống nước muối thứ 2, có đậm độ pha loãng 10^{-2} . Cứ như thế pha loãng tới đậm độ cần thiết. Mỗi đậm độ thay pipet mới.

- + Hàng thứ nhất xếp 3 ống canh thang lactose đặc, cấy mỗi ống 10 ml nước mẫu.
- + Hàng thứ 2 xếp 3 ống canh thang lactose loãng, cấy mỗi ống 1 ml mẫu nước.
- + Hàng thứ 3 xếp 3 ống canh thang lactose loãng, cấy mỗi ống 1 ml mẫu nước đậm độ 10^{-1} .
- + Hàng thứ 4, 5,... tiếp tục cấy đến đậm độ cần thiết.
- Nuôi cấy và ủ ấm $35-37^{\circ}\text{C}$ trong vòng 48 giờ ± 3 , khí trường thường.
- Đọc kết quả: Những ống lên men lactose sinh acid, chuyển màu môi trường xanh sang vàng và sinh hơi trong ống sinh hơi được coi là dương tính (+). Ghi tất cả những ống (+) theo các đậm độ cấy:

+3 ống canh thang lactose đặc, cấy 10 ml, (+) cả 3	ghi 3
+3 ống canh thang lactose loãng, cấy 1 ml nước (+) cả 3	ghi 3
+3 ống canh thang lactose, loãng, cấy 1 ml nước 10^{-1} (+) cả 3	ghi 3
+3 ống canh thang lactose loãng, cấy 1 ml nước 10^{-2} , chỉ (+) 2	ghi 2
+3 ống canh thang lactose loãng, cấy 1 ml nước 10^{-3} , (-) cả 3	ghi 0

Xác định dãy số phương pháp nhiều ống là: 3 3 3 2 0

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Định lượng Coliform: Chọn các ống lên men lactose và sinh hơi trong canh thang để xác định được các dãy số. Tra bảng MPN cho phương pháp cấy 9 ống hoặc 15 ống để tính số lượng vi khuẩn/100 ml nước.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Nếu xét nghiệm mẫu nước thải có số lượng coliform vượt quá tiêu chuẩn qui định cần áp dụng một số biện pháp can thiệp tạm thời cho đến khi nguồn nước được xử lý.

230. Vi khuẩn kháng thuốc - Phát hiện người mang

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện chủng vi khuẩn kháng thuốc cư trú ở người.

2. Nguyên lý

Ở một số người bệnh hoặc nhân viên y tế có thể mang các chủng vi khuẩn kháng thuốc nhưng không gây bệnh cảnh nhiễm trùng. Tuy nhiên, đây lại có thể là nguồn gốc gây nhiễm trùng bệnh viện. Sàng lọc phát hiện người mang chủng vi khuẩn kháng thuốc có ý nghĩa trong chiến lược kiểm soát nhiễm trùng bệnh viện.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ ẩm thường
- Tủ ẩm CO₂
- Hệ thống định danh tự động
- Máy đo độ đục
- Lò hấp ưót
- Tủ an toàn sinh học 2
- Máy lắc
- Ống độ đục chuẩn McFarland 0.5

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Xylen lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm đỏ Fucsin	ml	5,000

8	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000
9	Cồn tẩy 96 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Thuốc nhuộm Xanh Methylen	ml	5,000
12	Môi trường thạch máu thường	Đĩa	1,000
13	Môi trường thạch socola	Đĩa	1,000
14	Dải giấy kháng sinh	Cái	1,000
15	Thạch Muller Hinton	Đĩa	1,000
16	ID card	Test	1,000
17	AST card	Test	1,000
18	Dung dịch 0.45% Saline	ml	5,000
19	Unsensitized	Cái	2,000
20	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
21	Bông	Kg	0,001
22	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
23	Đèn cồn	Cái	0,0001
24	Panh	Cái	0,0001
25	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
26	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
27	Mũ	Cái	0,02
28	Khẩu trang	Cái	0,02
29	Găng tay	Đôi	3,000
30	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,02
31	Quần áo	Bộ	0,001
32	Axits ngâm lam	ml	10,000
33	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
34	Bút viết kính	Cái	0,02
35	Bút bi	Cái	0,01
36	Bật lửa	Cái	0,01
37	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
38	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
39	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
40	Khăn lau tay	Cái	0,03
41	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
42	QC		0,1
43	EQAS		0,005

* 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 lấy ở ngoài da, niêm mạc bằng tăm bông hoặc tăm bông thấm nước muối sinh lý vô trùng.

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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Cấy bệnh phẩm lên môi trường phân lập và môi trường canh thang tăng sinh
- Ủ ấm qua đêm
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ
- Nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng hệ thống tự động.
- Thử nghiệm kháng sinh đồ khoanh giấy khuếch tán
- Thử nghiệm kháng sinh đồ MIC.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn kháng thuốc liên quan đến nguồn gốc nhiễm trùng bệnh viện như MRSA, VRE... Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ loài và đặc tính kháng thuốc của vi khuẩn.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn gây bệnh

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện để nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây bệnh trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được bằng quy trình nuôi cấy này.

Bệnh phẩm lấy, vận chuyển và bảo quản không đúng yêu cầu có thể đưa đến kết quả âm tính hoặc dương tính giả (Xem Phụ lục 5).

231. Vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện - Phát hiện nguồn nhiễm

I. MỤC ĐÍCH VÀ NGUYÊN LÝ

1. Mục đích

Phát hiện nguồn gốc chủng vi khuẩn gây thường gây nhiễm trùng bệnh viện cư trú.

2. Nguyên lý

Ở một số người bệnh, nhân viên y tế, vật dụng y tế hoặc các yếu tố trong môi trường bệnh viện có thể chứa đựng các chủng vi khuẩn có khả năng gây nhiễm trùng bệnh viện. Sàng lọc phát hiện nguồn mang các chủng vi khuẩn này có ý nghĩa trong chiến lược kiểm soát nhiễm trùng bệnh viện.

II. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

- Người thực hiện: Cán bộ 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: cán bộ xét nghiệm 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

- Kính hiển vi quang học
- Tủ ấm thường
- Tủ ấm CO₂
- Hệ thống định danh tự động
- Máy đo độ đục
- Lò hấp ướt
- Tủ an toàn sinh học 2

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	Lọ lấy bệnh phẩm	Lọ	1,000
2	Que cấy	Cái	2,000
3	Lam kính	Cái	2,000
4	Dầu soi kính	ml	1,000
5	Xylen lau kính	ml	1,000
6	Nước muối sinh lý	ml	5,000
7	Thuốc nhuộm đỏ Fucsin	ml	5,000
8	Thuốc nhuộm tím Gentian	ml	5,000

9	Cồn tẩy 96 độ	ml	10,000
10	Lugol	ml	5,000
11	Thuốc nhuộm Xanh Methylen	ml	5,000
12	Môi trường thạch máu thường	Đĩa	1,000
13	Môi trường thạch socola	Đĩa	1,000
14	ID card	Test	1,000
15	AST card	Test	1,000
16	Dung dịch 0.45% Saline	ml	5,000
17	Unsensitized	Cái	2,000
18	Bơm kim tiêm	Cái	1,000
19	Bông	Kg	0,001
20	Cồn 90 độ (vệ sinh dụng cụ)	ml	10,000
21	Đèn cồn	Cái	0,0001
22	Panh	Cái	0,0001
23	Khay đựng bệnh phẩm	Cái	0,0001
24	Hộp vận chuyển bệnh phẩm	Cái	0,0001
25	Mũ	Cái	0,02
26	Khẩu trang	Cái	0,02
27	Găng tay	Đôi	3,000
28	Găng tay xử lý dụng cụ	Đôi	0,02
29	Quần áo	Bộ	0,001
30	Axits ngâm lam	ml	10,000
31	Ống nghiệm thủy tinh	Ống	1,000
32	Bút viết kính	Cái	0,02
33	Bút bi	Cái	0,01
34	Bật lửa	Cái	0,01
35	Sổ lưu kết quả xét nghiệm	Tờ	0,001
36	Cồn sát trùng tay nhanh	ml	1,000
37	Dung dịch nước rửa tay	ml	8,000
38	Khăn lau tay	Cái	0,03
39	Giấy trả kết quả xét nghiệm	Tờ	2,000
40	QC		0,1
41	EQAS		0,005

Môi trường nuôi cấy được tính trên tỉ lệ dương là 50 % so với tổng số bệnh phẩm gửi xét nghiệm.

Bộ Panel sử dụng để kiểm chuẩn được tính trên 5000 Test/1 năm.

* 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 lấy ở các vị trí, các nguồn nghi ngờ có mang vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện.

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 1).

2. Tiến hành kỹ thuật

- Cấy bệnh phẩm lên môi trường phân lập và môi trường canh thang tăng sinh
- Ủ ấm qua đêm
- Bắt khuẩn lạc nghi ngờ
- Nhuộm soi, thử nghiệm các tính chất sinh vật hóa học đơn giản và định danh bằng hệ thống tự động.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dương tính: Phân lập và định danh được vi khuẩn có khả năng gây nhiễm trùng bệnh viện. Trả kết quả tên vi khuẩn đến mức độ chi và/hoặc loài.
- Âm tính: Không tìm thấy hoặc không phân lập được vi khuẩn nghi ngờ gây nhiễm trùng bệnh viện.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Quy trình này chỉ áp dụng tìm vi khuẩn hiếu kỵ khí tùy tiện để nuôi cấy, không áp dụng cho các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc. Kết quả âm tính không có nghĩa là không có vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện trong bệnh phẩm mà là không tìm thấy căn nguyên vi khuẩn gây nhiễm trùng bệnh viện 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 (Xem Phụ lục 5).