

**BỘ Y TẾ  
CỤC Y TẾ DỰ PHÒNG**

**SỔ TAY  
XÉT NGHIỆM BỆNH TRUYỀN NHIỄM  
Tập I**

*(Ban hành kèm theo Quyết định số 217 /QĐ-DP ngày 02 tháng 12 năm 2016 của  
Cục trưởng Cục Y tế dự phòng)*

**Hà Nội, 2016**

**Chủ biên:**

ThS. Nguyễn Minh Hằng

**Ban soạn thảo:** TS. Nguyễn Xuân Tùng

ThS. Trần Thị Thu Hương

ThS. Phạm Thị Thu Hằng

PGS.TS. Vũ Thị Quế Hương

ThS. Nguyễn Ngọc Hưng

ThS Nguyễn Bảo Triệu

TS. Nguyễn Thu Hương

TS. Nguyễn Thị Hương Bình

TS. Đào Tuyết Trinh

ThS. Võ Minh Hiền

ThS. Hà Thị Cẩm Vân

TS. Phan Thị Thu Hương

**Tổ biên tập:** TS. Trịnh Xuân Tùng

ThS. Nguyễn Thị Phương Chi

BS. Nguyễn Thị Phương Thảo

CN. Đỗ Thị Thu.

## LỜI TỰA

Nhằm từng bước thực hiện lộ trình phát triển hệ thống y tế dự phòng tại Chiến lược quốc gia y tế dự phòng Việt Nam đến năm 2010 và định hướng đến năm 2020 được Thủ tướng chính phủ ban hành tại Quyết định số 255/2006/QĐ-TTg ngày 09/11/2006 trong đó định hướng xây dựng hệ thống phòng xét nghiệm tiên tiến, hiện đại phù hợp với nhu cầu phòng, chống dịch bệnh, hệ thống phòng xét nghiệm đã từng bước được hoàn thiện cả về trang thiết bị và hoạt động.

Trong thời gian vừa qua dưới sự quan tâm chỉ đạo của các cấp chính quyền từ trung ương đến địa phương, hệ thống xét nghiệm bệnh truyền nhiễm được củng cố, tăng cường hướng tới mục tiêu hội nhập toàn cầu. Chính vì vậy, công tác phòng bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, mới nổi với tỷ lệ tử vong cao như SARS, cúm A(H5N1), cúm A(H1N1) đại dịch, Ebola, MERS-CoV, cúm A(H7N9)... đã đạt được một số kết quả tích cực, tuy nhiên cùng với phát triển của nền kinh tế thị trường, quá trình đô thị hóa, hiện tượng di biến động dân số đã làm gia tăng nguy cơ lây lan các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm.

Để hỗ trợ cán bộ y tế dự phòng trong việc thực hiện công tác xét nghiệm bệnh truyền nhiễm, đảm bảo chất lượng xét nghiệm cũng như thực hành an toàn sinh học trong phòng xét nghiệm, đảm bảo tính thống nhất giữa các phòng xét nghiệm, Bộ Y tế ban hành Tập I “Sổ tay xét nghiệm bệnh truyền nhiễm” gồm các bệnh Cúm, Rubella, Sốt xuất huyết Dengue, Sởi, Tay chân miệng, Zika, Lao, Sốt rét và Viêm màng não mô cầu. Tài liệu này sẽ giúp cho các phòng xét nghiệm bệnh truyền nhiễm nắm rõ các yêu cầu cơ bản cũng như cụ thể về nhân sự, cơ sở vật chất, trang thiết bị, nguyên tắc và quy trình chi tiết thực hiện xét nghiệm, các yêu cầu về an toàn sinh học nhằm đảm bảo tránh lây nhiễm từ phòng xét nghiệm để phục vụ việc chẩn đoán tác nhân gây bệnh truyền nhiễm.

Tôi mong rằng Sổ tay này sẽ là một tài liệu hữu ích cho cho các cán bộ và phòng xét nghiệm bệnh truyền nhiễm tại Việt Nam trong việc xây dựng và triển khai hoạt động xét nghiệm, từ đó từng bước nâng cao năng lực xác định các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, mới nổi để góp phần phòng chống dịch bệnh, bảo vệ sức khỏe người dân.

THỨ TRƯỞNG BỘ Y TẾ



GS.TS. Nguyễn Thanh Long

## MỤC LỤC

<b>NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT</b> .....	F
<b>BỆNH CÚM</b> .....	1
I. Mô tả chung .....	1
II. Yêu cầu chung .....	1
1. Nhân sự .....	1
2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị .....	1
3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm .....	3
4. Đọc và đánh giá kết quả.....	4
5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm ..	5
III. Phương pháp xét nghiệm cúm.....	7
1. Phạm vi áp dụng.....	7
2. Nguyên lý của phương pháp xét nghiệm .....	7
3. An toàn sinh học .....	8
4. Thực hiện xét nghiệm .....	8
5. Phiên giải kết quả xét nghiệm.....	15
IV. Tài liệu tham khảo .....	16
<b>BỆNH RUBELLA</b> .....	17
I. Mô tả chung .....	17
II. Yêu cầu chung .....	17
1. Nhân sự: .....	17
2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị .....	18
3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm .....	19
4. Đọc và đánh giá kết quả:.....	20
5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm	21
III. Phương pháp xét nghiệm .....	21
1. Xét nghiệm huyết thanh học phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu vi rút Rubella bằng kỹ thuật ELISA.....	21
2. Phương pháp xét nghiệm RT-PCR phát hiện ARN của vi rút Rubella .....	24

IV. Tài liệu tham khảo .....	28
<b>BỆNH SỐT XUẤT HUYẾT DENGUE</b> .....	29
I. Mô tả chung .....	29
II. Yêu cầu chung .....	29
1. Nhân sự .....	29
2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị .....	29
3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm .....	30
4. Đọc và đánh giá kết quả.....	32
5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm	32
III. Phương pháp xét nghiệm .....	33
1. Phương pháp xét nghiệm nhanh phát hiện kháng nguyên vi rút Dengue (NS1).....	34
2. Phương pháp xét nghiệm nhanh phát hiện kháng thể kháng vi rút Dengue (IgM, IgG).....	35
3. Phương pháp xét nghiệm ELISA phát hiện kháng nguyên vi rút Dengue (NS1).....	39
4. Phương pháp xét nghiệm ELISA phát hiện kháng thể IgM/ IgG virút Dengue.....	43
5. Phương pháp xét nghiệm bán lồng RT-PCR (semi-nested RT- PCR) chẩn đoán và định tít vi rút Dengue .....	46
6. Phương pháp xét nghiệm đa môi realtime RT-PCR (Mutiplex realtime RT-PCR) chẩn đoán và định tít vi rút Dengue.....	54
IV. Tài liệu tham khảo .....	58
<b>BỆNH SỐI</b> .....	61
I. Mô tả chung .....	61
II. Yêu cầu chung .....	61
1. Nhân sự: .....	61
2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị .....	61
3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm .....	62
4. Đọc và đánh giá kết quả:.....	64
5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm	64

III. Phương pháp xét nghiệm .....	65
1. Xét nghiệm huyết thanh học phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu vi rút sởi bằng kỹ thuật ELISA. ....	65
2. Phương pháp xét nghiệm RT-PCR phát hiện ARN của vi rút Sởi	68
IV. Tài liệu tham khảo .....	72
<b>BỆNH TAY CHÂN MIỆNG .....</b>	<b>73</b>
I. Mô tả chung .....	73
II. Yêu cầu chung .....	73
1. Nhân sự .....	73
3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm .....	74
4. Đọc và đánh giá kết quả.....	76
5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm	76
III. Phương pháp xét nghiệm tay-chân-miệng bằng phương pháp chẩn đoán RT-PCR.....	76
1. Phạm vi áp dụng.....	77
2. Nguyên lý.....	77
3. An toàn sinh học .....	77
4. Thực hiện xét nghiệm .....	77
5. Phiên giải kết quả xét nghiệm.....	81
IV. Tài liệu tham khảo .....	82
<b>BỆNH DO VI RÚT ZIKA .....</b>	<b>83</b>
I. Mô tả chung .....	83
II. Yêu cầu chung .....	83
1. Nhân sự .....	83
2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị .....	83
3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm .....	84
4. Đọc và đánh giá kết quả.....	86
5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm	86
III. Phương pháp xét nghiệm xác định vi rút Zika bằng RT-PCR và realtime RT-PCR.....	87
1. Phạm vi áp dụng.....	87

2. Nguyên lý.....	87
3. An toàn sinh học .....	87
4. Thực hiện xét nghiệm .....	88
5. Phiên giải kết quả xét nghiệm.....	93
IV. Tài liệu tham khảo .....	94
<b>BỆNH SỐT RÉT .....</b>	<b>96</b>
I. Mô tả chung .....	96
II. Yêu cầu chung.....	96
1. Nhân sự .....	96
2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị.....	96
3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm .....	98
4. Đọc và đánh giá kết quả.....	100
5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm.....	100
III. Phương pháp xét nghiệm .....	100
1. Phương pháp xét nghiệm lam máu nhuộm giem sa soi trên kính hiển vi quang học .....	101
2. Kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán nhanh phát hiện sốt rét (Rapid diagnostic Test - RDTs) .....	110
3. Phương pháp xét nghiệm xác định 4 loài ký sinh trùng sốt rét <i>P.</i> <i>falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i> gây bệnh cho người trên mẫu máu bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymerase đa môi bán lồng (Seminested Multiplex PCR) .....	114
4. Phương pháp xác định 4 loài ký sinh trùng sốt rét <i>P.falciparum</i> , <i>P.vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P.ovale</i> gây bệnh trên người bằng kỹ thuật PCR lồng (Nested PCR) .....	123
5. Phương pháp xét nghiệm xác định 4 loài ký sinh trùng sốt rét <i>P.</i> <i>falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i> gây bệnh cho người trên mẫu máu bằng kỹ thuật realtime PCR .....	129
IV. Tài liệu tham khảo .....	135
<b>BỆNH VIÊM MÀNG NÃO DO NÃO MÔ CẦU .....</b>	<b>137</b>
I. Mô tả chung .....	137

II. Yêu cầu chung: .....	137
1. Nhân sự .....	137
2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị .....	138
3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm .....	139
4. Đọc và đánh giá kết quả.....	140
5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm: .....	140
III. Phương pháp xét nghiệm .....	140
1. Phương pháp chẩn đoán nhanh (RDT): .....	141
2. Phương pháp nhuộm Gram soi kính hiển vi .....	144
3. Phương pháp nuôi cấy.....	146
4. Phương pháp cấy trên máy tự động (ví dụ trên máy BATEC) ...	148
5. Phương pháp định danh vi khuẩn <i>N. meningitidis</i> dựa vào tính chất sinh vật hóa học.....	150
6. Định danh vi khuẩn <i>N. meningitidis</i> bằng máy định danh tự động (ví dụ máy Malditof) .....	154
7. Định danh vi khuẩn <i>N. meningitidis</i> bằng máy định danh tự động (ví dụ Vitek 2 Compac).....	156
8. Xét nghiệm realtime PCR .....	158
IV. Tài liệu tham khảo .....	161



## NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

μl	Micro lít.
AND	Axít Deroxyribonucleic
ATSH	An toàn sinh học.
Base Pair – bp	Cặp nucleic.
Centers for Disease Control and Prevention – CDC	Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ
Complementary DNA – cADN	ADN bổ sung từ khuôn ARN nhờ enzyme phiên mã ngược.
dATP	Deoxyadenosine triphosphate / nucleic A
dCTP	Deoxycytidine triphosphate / nucleic C
dd.	Dung dịch.
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate / nucleic G
dNTP	Là tên chung các Deroxyribonucleic triphosphate gồm dATP, dCTP, dGTP, dTTP
dTTP	Deoxythymidine triphosphate / nucleic T
KST	Ký sinh trùng;
KSTSR	Ký sinh trùng sốt rét;
Mock	Chứng âm chiết tách
Negative Control – NC	Chứng âm phản ứng
PXN	Phòng xét nghiệm
Polymerase Chain Reaction - PCR	Phản ứng chuỗi polymerase
Positive Control – PC	Chứng dương
Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction - RT-PCR	Phản ứng phiên mã ngược-khuếch đại chuỗi.
RNA	Axít ribonucleic
SHPT	Sinh học phân tử
Standard Operating Procedure - SOP	Quy trình kỹ thuật chuẩn
TCM	Bệnh tay-chân-miệng.
Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory - VIDRL	Phòng thí nghiệm tham chiếu các bệnh truyền nhiễm ở Victoria, Melbourne –Úc.
VRDR	Vi rút đường ruột.
World Health Organization - WHO	Tổ Chức Y tế thế giới

# **BỆNH CÚM**

## **(Influenza)**

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

### **I. Mô tả chung**

Cúm là một bệnh truyền nhiễm cấp tính lây theo đường hô hấp, do các vi rút cúm A,B,C gây nên. Bệnh khởi phát đột ngột bằng hội chứng nhiễm trùng nhiễm độc, hội chứng viêm long đường hô hấp. Bệnh hay gây biến chứng ở đường hô hấp và rất dễ phát thành dịch. Tại Việt Nam, hội chứng cúm xảy ra quanh năm, có tỷ lệ mắc đứng đầu trong 10 bệnh truyền nhiễm cấp tính.

Vi rút cúm thuộc họ Orthomyxoviride, gồm năm chi: vi rút cúm A, vi rút cúm B, vi rút cúm C, vi rút Isa và vi rút Thogoto. Vi rút cúm có hình cầu, đôi khi hình sợi, kích thước khoảng 80 - 100 nm, dễ bị diệt ở nhiệt độ thông thường, chịu đựng tốt ở nhiệt độ thấp. Các vi rút cúm có 3 loại kháng nguyên: Kháng nguyên S (Soluble), Kháng nguyên H (Hemagglutinin), Kháng nguyên N (Neuraminidase). Cấu trúc gen của vi rút cúm là ARN sợi đơn được bao bọc Glycoprotein, các kháng nguyên H và N là những thành phần của vỏ vi rút cúm. Hai kháng nguyên H và N quyết định đến khả năng gây bệnh của virus cúm và mang tính đặc hiệu týp. Tuy nhiên, các cấu trúc H và N lại có thể thay đổi thành các H và N mới. Hiện nay đã phát hiện được 18 cấu trúc kháng nguyên H, ký hiệu từ H1 đến H18 và 9 cấu trúc kháng nguyên N ký hiệu từ N1 đến N9.

### **II. Yêu cầu chung**

#### **1. Nhân sự**

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

- Tất cả nhân viên kỹ thuật xét nghiệm cần được đào tạo về sử dụng trang thiết bị, đào tạo về thực hành an toàn sinh học (ATSH) và thực hành vi sinh chuẩn, đào tạo về đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Nhân viên phòng xét nghiệm được đào tạo các nội dung sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

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

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

- Thực hiện tiêm chủng cúm định kỳ cho nhân viên phòng xét nghiệm.

#### **2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị**

##### **2.1. Cơ sở vật chất:**

- Phòng xét nghiệm cần đáp ứng về điều kiện an toàn sinh học, hệ thống quản lý chất lượng phòng xét nghiệm (PXN) theo quy định hiện hành.

- Các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán vi rút cúm A, cúm B, và các phân týp cúm được áp dụng tại PXN ATSH cấp II. Đối với việc thực hiện các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán với vi rút cúm A/H5N1 và A/H7N9 thì thực hiện tại PXN ATSH cấp II nhưng đảm bảo hộ cá nhân và thực hành tuân thủ theo quy định đối với PXN ATSH cấp III; đối với việc thực hiện nuôi cấy, phân lập với vi rút sởi thì thực hiện tại PXN ATSH cấp III.

- Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật RT-PCR cần 4 khu vực/phòng xét nghiệm riêng, bao gồm: khu vực/phòng pha dung dịch phản ứng (1), khu vực/phòng tách chiết ARN (2), khu vực/phòng đặt máy PCR(3) và khu vực/phòng điện di (4). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) ⇒(2) ⇒ (3) ⇒ (4).

- Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật realtime RT-PCR cũng tương tự như RT-PCR, tuy nhiên không có khu vực/phòng điện di.

## 2.2. Trang thiết bị

**Bảng 1: Trang thiết bị**

Tên thiết bị	RT-PCR	realtime RT-PCR
Micropipette	03 bộ	03 bộ
Tủ lạnh bảo quản mẫu	01 cái	01 cái
Tủ ATSH cấp 2	01 cái	01 cái
Nồi hấp ướ	01 cái	01 cái
Máy ly tâm lạnh tốc độ tối đa 14000 vòng/phút	01 cái	01 cái
Máy vortex	02 cái	02 cái
Giá tích lạnh	02 cái	02 cái
Tủ thao tác PCR	01 cái	01 cái
Máy PCR	01 cái	
Máy realtime PCR		01 cái
Máy làm đá vảy	01 cái	01 cái
Hệ thống máy điện di	01 bộ	
Lò vi sóng	01 cái	
Tủ lạnh âm sâu bảo quản mẫu	01 cái	01 cái
Tủ lạnh -20°C bảo quản mẫu ARN	01 cái	01 cái
Tủ lạnh -20°C bảo quản sinh phẩm	01 cái	01 cái
Cân	01 cái	01 cái

- Hồ sơ thiết bị gồm: hồ sơ xác nhận ban đầu của thiết bị, lý lịch thiết bị, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Cần có danh sách thiết bị, hướng dẫn sử dụng thiết bị.

- Đào tạo cho các nhân viên vận hành thiết bị theo đúng hướng dẫn.

### **3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm**

#### **3.1. Trước xét nghiệm**

##### **3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu đầu vào**

- Loại mẫu: dịch họng, dịch mũi, dịch tị hầu hoặc dịch nội khí quản, từ 3 ml đến 5 ml.

- Điều kiện bảo quản: môi trường vận chuyển vi rút - MEM 2% BSA.

- Bảo quản tại nơi lấy mẫu: bảo quản mẫu bệnh phẩm tại nơi lấy mẫu ở 2°C - 8°C, trong vòng 72 giờ mẫu sẽ được chuyển tới phòng xét nghiệm, trong trường hợp bảo quản trên 72 giờ cần bảo quản tại nhiệt độ -70°C. Trong quá trình vận chuyển giữ tại 2°C - 8°C hoặc tại -70°C trong trường hợp đã bảo quản mẫu ở nhiệt độ -70°C.

- Kiểm tra chất lượng mẫu: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, chất lượng tốt, đủ thể tích mẫu cho xét nghiệm.

- Kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hay phiếu yêu cầu xét nghiệm.

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

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

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

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

- Hóa chất sinh phẩm sử dụng trong phản ứng sinh học phân tử phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định của hóa chất/sinh phẩm.

- Hóa chất sinh phẩm khi nhận về phải được kiểm tra, đánh giá chất lượng.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

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

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

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

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

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

#### **3.2. Trong xét nghiệm**

##### **3.2.1. Nội kiểm**

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

- Chứng âm:
  - + Chứng âm phản ứng (NTC): phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR hoặc/và realtime RT-PCR.
  - + Chứng âm tách chiết (NEC): mẫu tách chiết là môi trường vận chuyển và được tách chiết cùng mẫu bệnh phẩm: phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR hoặc/và realtime RT-PCR.
- Chứng dương: vi rút cúm A (phân týp cúm A: A/H1N1; A/H3N2; A/H1N1pdm; A/H5N1; A/H7N9) và cúm B.

### **3.2.2. Đánh giá từ bên ngoài**

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

### **3.3. Sau xét nghiệm**

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

- Mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được cất vào hộp và lưu trong tủ lạnh sâu (từ -70°C trở xuống).
- Sau khi cất mẫu vào hộp, nhân viên phòng xét nghiệm ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào Sổ lưu giữ mẫu.
- Tất cả các mẫu bệnh phẩm được xếp vào hộp theo thứ tự từng năm và có sổ lưu giữ mẫu bệnh phẩm và sơ đồ tủ lưu giữ.
- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

#### **3.3.2. Tiêu hủy bệnh phẩm**

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

### **4. Đọc và đánh giá kết quả**

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

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

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

### 5.1 Lập kế hoạch bố trí thử nghiệm, xác định rõ:

- Cách thức chuẩn bị mẫu.
- Người chuẩn bị mẫu, người thực hiện, người đánh giá kết quả.
- Tiêu chuẩn đánh giá
- Thời gian chuẩn bị mẫu, tiến hành xét nghiệm, và báo cáo kết quả.
- Phê duyệt.

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

Chỉ số	Số lượng mẫu bệnh phẩm /lặp
Độ chính xác	20 mẫu
Giới hạn phát hiện (LOD)	Pha loãng nhiều nồng độ từ 1 mẫu dương tính
Độ lặp	5 mẫu/nồng độ x 2 nồng độ
Độ tái lặp	3 lần lặp/mẫu x 3 mẫu
Độ nhạy/ độ đặc hiệu	20 mẫu
Ước lượng độ không đảm bảo đo	

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

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

**Bảng 3: Đọc đánh giá xét nghiệm**

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

- Tính toán số liệu:

+ Độ chính xác (Accuracy) =  $(a+d)/N$

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

+ Độ nhạy (Sensitivity) =  $a/(a+b)$

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

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

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

### 5.3. Độ chụm (gồm độ lặp và độ tái lặp):

- Bố trí thực hiện bộ mẫu để kiểm tra tính chính xác gồm 3 mẫu (01 mẫu dương tính mạnh, 01 mẫu dương tính yếu và 01 mẫu âm tính).

- Độ lặp: Bộ mẫu được thực hiện lặp lại trong cùng một điều kiện về con người, sinh phẩm và thiết bị.

- Độ tái lặp: Bộ mẫu được thực hiện lặp lại trong cùng một điều kiện về sinh phẩm và thiết bị nhưng thay đổi về con người, thời gian.

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

- Tính toán số liệu:

Giá trị trung bình (Mean)  $\bar{y} = \Sigma y_i / n$

Độ lệch chuẩn (lặp và tái lặp) (SD)  $SD = \sqrt{\frac{\Sigma (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$

Hệ số biến thiên (CV)  $CV = (sd/\bar{y}) * 100$

Trong đó:

+  $y_i$  là giá trị thu được trong mỗi lần thực hiện xét nghiệm.

+  $n$  là số lần làm lặp lại.

### 5.3. Giới hạn phát hiện (Limit of detection: LOD)

Thực hiện pha loãng mẫu dương tính xác định đến độ pha loãng lớn nhất mà vẫn kết quả xét nghiệm vẫn dương tính.

### 5.4. Ước lượng độ không đảm bảo đo (Uncertain: U)

- Ước lượng độ không đảm bảo đo sử dụng kết quả độ không đảm bảo đo của các trang thiết bị trực tiếp tham gia vào xét nghiệm, độ lệch chuẩn của độ lặp, độ tái lặp và chứng nội bộ.

- Tính toán số liệu:

$$U = \sqrt{U_{TB}^2 + SD_{l\grave{a}p}^2 + SD_{t\grave{a}i\ l\grave{a}p}^2 + SD_{ch\grave{u}ng\ n\grave{o}i\ b\grave{o}}^2}$$

Trong đó:

+  $U_{TB}$  : Độ không đảm bảo đo của các trang thiết bị đo tham gia trực tiếp vào xét nghiệm.

+  $SD_{l\grave{a}p}^2$  : độ lệch chuẩn của độ lặp.

+  $SD_{t\grave{a}i\ l\grave{a}p}^2$  : độ lệch chuẩn của độ tái lặp.

+  $SD_{ch\grave{u}ng\ n\grave{o}i\ b\grave{o}}^2$  : độ lệch chuẩn của chứng nội bộ.

### 5.5. Đánh giá kết quả:

Dựa vào việc so sánh các kết quả thực hiện so với tiêu chuẩn của quy trình tiêu chuẩn hoặc tiêu chuẩn nội bộ đề ra.

- Với quy trình tiêu chuẩn: Việc xác nhận giá trị sử dụng phương pháp được kết luận là đạt khi:

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

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

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

- Với quy trình phi tiêu chuẩn:

+ Độ chính xác  $\geq 90\%$ ;

+ Độ đặc hiệu  $\geq 90\%$ ;

- + Độ nhạy  $\geq 90\%$ ;
- + Tỷ lệ dương tính giả  $\leq 10\%$ ;
- + Tỷ lệ âm tính giả  $\leq 10\%$ ;
- Kết quả đánh giá tính chính xác khi hệ số biến thiên CV  $< 10\%$ ;

### **5.6. Xem xét định kỳ phương pháp xét nghiệm**

Cần xem xét tính hiệu quả của phương pháp xét nghiệm định kỳ hàng năm thông qua các thông số sau nhưng không giới hạn:

- Độ tái lặp (tổng hợp từ kết quả kiểm tra chất lượng trong năm).
- Kết quả tham gia ngoại kiểm.
- Lỗi hệ thống (áp dụng cho các phương pháp có sử dụng thiết bị).

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

## **III. Phương pháp xét nghiệm cúm**

Xét nghiệm chẩn đoán sinh học phân tử rút cúm dựa trên phát hiện vật liệu di truyền vi rút cúm bằng phương pháp chẩn đoán RT-PCR và realtime RT-PCR. Quy trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc xác định cúm B, cúm A và các phân týp cúm A trong mẫu bệnh phẩm hoặc dịch nuôi cấy.

### **1. Phạm vi áp dụng**

Quy trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc xác định cúm B, cúm A và các phân týp cúm A trong mẫu bệnh phẩm hoặc dịch nuôi cấy.

### **2. Nguyên lý của phương pháp xét nghiệm**

#### **2.1. Nguyên lý của RT-PCR**

ARN của vi rút cúm được phiên mã ngược thành cADN. Sau đó cADN được cho vào tuýp chứa dung dịch (dung dịch) phản ứng PCR bao gồm cặp mồi đặc hiệu cho vi rút cúm, enzyme Taq ADN polymerase, dNTPs... Tuýp phản ứng được đặt vào máy luân nhiệt PCR để khuếch đại đoạn trình tự đích theo chương trình nhiệt được cài đặt sẵn. Quá trình tổng hợp gồm khoảng 30-35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước chính: (i) bước biến tính ở nhiệt độ khoảng 94 °C - 95 °C; (ii) bước gắn mồi ở nhiệt độ khoảng 50 °C - 55°C; và (iii) bước kéo dài ở nhiệt độ 72 °C. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose để phát hiện sự có mặt hay không của đoạn gen đích đã được khuếch đại.

#### **2.2. Nguyên lý của realtime RT-PCR**

Khác với RT-PCR thông thường, phương pháp này sử dụng một mẫu dò phát huỳnh quang (probe) có khả năng phát hiện sản phẩm PCR đặc hiệu trong quá trình tổng hợp sản phẩm.

Mẫu dò là một đoạn olionucleotit (vd: Taqman<sup>®</sup> probe) được gắn với một chất nhuộm phát tín hiệu huỳnh quang ở đầu 5' (R), đầu kia thì được gắn với thuốc nhuộm dập tắt huỳnh quang (Q). Khi mẫu dò còn nguyên vẹn, Q có vai trò nhận năng lượng phát ra từ R (hiệu ứng chuyển năng lượng huỳnh quang). Nếu có trình tự đích, mẫu dò và mồi sẽ gắn vào khuôn, quá trình tổng hợp bắt đầu. Trong quá trình tổng hợp, en-zim Taq ADN



polymerase với hoạt tính exonuclease sẽ cắt các nucleotit của mẫu dò từ đầu 5', giải phóng R khỏi Q, làm tăng tín hiệu huỳnh quang của R. Càng nhiều sản phẩm tạo thành thì càng nhiều mẫu dò bị phân cắt và tín hiệu của R phát ra càng nhiều. Mắt đọc tín hiệu huỳnh quang của máy sẽ thu tín hiệu R, xử lý bằng phần mềm và đưa ra kết quả cuối cùng.

### **3. An toàn sinh học**

- Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về an toàn sinh học theo quy định hiện hành đối với Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp II.

- Thuốc nhuộm ethidium bromide là một chất độc có thể gây ung thư cho người và động vật. Do đó, khi sử dụng hóa chất này phải mang găng tay và kính bảo hộ. Dung dịch sau khi sử dụng phải cho chảy qua than hoạt tính trước khi đổ bỏ hoặc có biện pháp xử lý chuyên biệt khác.

- Tham khảo các thuốc nhuộm khác an toàn như Sybr Green, GelRed, v.v.

### **4. Thực hiện xét nghiệm**

#### **4.1. Mẫu bệnh phẩm/dịch nuôi cấy (đối với cả hai phương pháp RT-PCR và realtime RT-PCR)**

##### **4.1.1. Loại mẫu:**

Mẫu dịch họng, dịch mũi, dịch tị hầu hoặc dịch nội khí quản: từ 3 ml đến 5 ml.

##### **4.1.2. Yêu cầu:**

Bệnh phẩm bảo đảm chất lượng đầu vào theo mục 3.1.1 hướng dẫn này.

Mẫu được tách chiết theo thường quy của kit tách chiết. Có thể tham khảo quy trình tách chiết của bộ kit QIAamp viral RNA Mini – QIAGEN hoặc tương đương.

##### **4.1.3. Tách chiết mẫu**

###### **a. Đệm AVL:**

- Kiểm tra đệm AVL, đảm bảo dung dịch đệm đồng nhất.
- Chuyển 560 µl đệm AVL có chứa chất mang ARN vào mỗi tuýp ly tâm 1,5ml vô trùng.
- Bảo quản ở nhiệt độ -15°C đến -30°C và theo hạn sử dụng của kit tách chiết.

###### **b. Đệm AW1:**

- Bổ sung Ethanol (96-100%) vào chai đệm AW1 theo hướng dẫn của kit tách chiết.
- Đánh dấu trên nắp chai đã thêm ethanol và ghi ngày tháng năm chuẩn bị đệm AW1 trên chai.
- Bảo quản ở nhiệt độ phòng theo hạn sử dụng của kit tách chiết.

###### **c. Đệm AW2**

- Bổ sung Ethanol 96 - 100% vào chai AW2 theo hướng dẫn của kit tách chiết.
- Đánh dấu trên nắp chai đã thêm ethanol và ghi ngày, tháng, năm chuẩn bị đệm AW2 trên chai.

- Bảo quản ở nhiệt độ phòng theo hạn sử dụng của kit tách chiết.

#### **d. Các bước tiến hành**

- Kiểm tra độ đồng nhất 560  $\mu$ l đệm AVL có chứa chất mang ARN trong tuýp 2 ml.

- Thêm 140  $\mu$ l mẫu vào 560  $\mu$ l dung dịch ly giải vi rút AVL có chất mang ARN.

- Trộn bằng máy trộn khoảng 15 giây, để tạo một hỗn dịch đồng nhất giữa mẫu và đệm AVL, ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút (đảm bảo các hạt vi rút bị ly giải hoàn toàn, ARN của vi rút bị ly giải được gắn vào chất mang ARN).

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

- Ly tâm nhanh khoảng 10 giây.

- Cho 630  $\mu$ l hỗn dịch trên vào cột QIAamp, ly tâm 8000 vòng trong 1 phút. Tất cả ARN sẽ được gắn trên bề mặt màng Silicagel với sự có mặt của chất mang ARN. Chuyển cột sang tuýp 2 ml mới.

- Mở nắp cột QIAamp, lặp lại bước 6.

- Mở nắp cột QIAamp, thêm 500  $\mu$ l đệm AW1. Đóng nắp và ly tâm 8000 vòng trong 1 phút. Chuyển cột spin sang tuýp 2 ml sạch và loại bỏ tuýp có chứa dịch lọc. AW1 có tác dụng loại bỏ các thành phần không phải là ARN có trên mặt màng Silicagel.

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

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

- Mở nắp cột spin QIAamp, thêm 60 $\mu$ l đệm AVE và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm 8000 vòng trong 1 phút để toàn bộ ARN tách khỏi màng Si li cát. Sau khi ly tâm toàn bộ ARN của mẫu sẽ được thu hồi trong dịch lọc.

- Lưu giữ mẫu đã tách chiết ở nhiệt độ -20°C, âm sâu hoặc theo quy định tại đơn vị.

- Mẫu sau khi tách chiết được xét nghiệm bằng chạy phản ứng theo phương pháp RT-PCR hoặc realtime RT-PCR

#### **4.2. Các bước tiến hành phản ứng RT-PCR**

##### **4.2.1. Sinh phẩm, hóa chất cho phản ứng RT-PCR**

- Thao tác được thực hiện tại tủ thao tác PCR phòng chuẩn bị dung dịch phản ứng. Sinh phẩm dùng trong phản ứng RT-PCR: QIAGEN Onestep RT-PCR hoặc tương đương.

- Xếp các hoá chất, sinh phẩm cần sử dụng lên hộp tích lạnh theo thứ tự trong bảng pha dung dịch phản ứng.

- Đánh dấu tuýp 1,5 ml hoặc tuýp 0,5 ml dùng để trộn sinh phẩm và đặt lên hộp tích lạnh.

- Xác định số lượng phản ứng (N) cần làm:  $N = n + 1$  (với n: là tổng số mẫu xét nghiệm cộng với 1 chứng dương ARN).

- Xác định số lượng mẫu cần xét nghiệm (n) và pha hỗn hợp phản ứng theo bảng sau:

**Bảng 4: Thành phần sinh phẩm cần cho xét nghiệm cúm\***

Sinh phẩm	Thể tích (μl)	Thể tích cho N phản ứng (μl)
Đệm PCR 5x	4,0	4,0 xN
Đệm Q	4,0	4,0 xN
dNTPs (kit)	0,8	0,8 x N
Môi xuôi (5 μM)	3,0	3,0 x N
Môi ngược (5 μM)	3,0	3,0 x N
Enzyme mix (kit)	0,8	0,8 x N
Nước cất 2 lần (Nuclease Free Water)	1,4	0,1 x N
ARN mẫu	3,0	
Tổng số	<b>20</b>	

\* Ghi chú: Sinh phẩm sử dụng cho xét nghiệm cúm A, cúm B và phân týp cúm A/H3, A/H1N1/09 đại dịch, A/H5, A/H7

#### 4.2.2 Chuẩn bị cặp môi cho phương pháp RT-PCR

**Bảng 5: Bộ môi cho phản ứng RT-PCR**

Môi	Tên môi	Trình tự ( 5'-3' )
Cúm A	M30F2/08	ATG AGY CTT YTA ACC GAG GTC GAA ACG
	M264R3/08	TGG ACA AAN CGT CTA CGC TGC AG
Cúm A/H1N1/09 đại dịch	swH1 Conv-F1	TGC ATT TGG GTA AAT GTA ACA TTG
	swH1 Conv-R1	AAT GTA GGA TTT RCT GAK CTT TGG
H3 (CDC)	H3 HA F	AAG CAT TCC YAA TGA CAA ACC
	H3 HA R	ATT GCR CCR AAT ATG CCT CTA GT
H5 (WHO-HK)	H5-1	GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC
	H5-3	CTC CCC TGC TCA TTG CTA TG
B (CDC)	Flu B F	TCC TCA ACT CAC TCT TCGAGC G
	Flu B R	CGG TGC TCT TGA CCA AAT TGG
H7 (NIID)	NIID-H7 F1	CAATGGAGAAAYCAGCAYACAATTGAT
	NIID-H7 R1	ACATGATGCCCCGAAGCTAAAC

- Trả lại nước khử ion theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đạt nồng độ gốc.

- Nồng độ môi sau đó được pha từ nồng độ gốc và tính theo đơn vị nmol (ghi trên tuýp môi đông khô).

- Cách hoàn nguyên môi:

$C_M = n/V$  Trong đó: V – thể tích nước cân hoàn nguyên

n – nồng độ gốc

$C_M$  – nồng độ cần hoàn nguyên

- Chia ra các tuýp có thể tích 300 µl / 1 loại môi và bảo quản tại nhiệt độ -20°C.

#### 4.2.3 Chuẩn bị thạch điện di

Sử dụng dung dịch TBE thương mại hoặc pha dung dịch TBE như bên dưới.

- Pha dung dịch đậm TBE 10X:

+ Tris Base 108 g

+ Boric acid 55 g

+ Nước cất 600 ml

+ Hòa tan Tris Base và Boric acid trong nước

+ Thêm EDTA 0.5M, pH8 20 ml

+ Thêm nước cất cho đủ 1000 ml

+ Kiểm tra pH trong khoảng 8 – 8,3; nếu pH ngoài khoảng này thì phải pha lại, không chỉnh pH bằng hóa chất vì sự thay đổi nồng độ ion sẽ ảnh hưởng đến sự di chuyển của ADN trong bản thạch khi điện di.

+ Hấp kiệt trùng ở nhiệt độ 121°C/ 20 phút

+ Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- Pha dung dịch đậm TBE 1X:

Khi sử dụng lấy 100ml TBE 10X pha vào 900ml nước cất thành dung dịch TBE 1X, bảo quản ở nhiệt độ phòng.

#### Bảng 6: Thành phần hóa chất chuẩn bị gel nồng độ 2,5%

Nồng độ Agarose	Nồng độ 2,5%
TBE 1x (ml)	100,0
Agarose (g)	2,5
Ethidium bromide 10mg/ ml	10,0

- Nồng độ hóa chất được pha theo hướng dẫn tại Bảng 6.

- Cách đổ thạch:

+ Đổ thạch bằng khay điện di có cài sẵn rãnh lược.

+ Đo lượng Agarose và TBE phụ thuộc vào nồng độ thạch và số lượng khuôn thạch cần chuẩn bị được tính theo bảng trên. Ví dụ: Chuẩn bị 100 ml thạch 2,5%: cần 2,5 g Agarose bột và 100ml TBE. Sau đó cho Agarose bột và dung dịch TBE vào cốc thủy tinh. Làm tan Agarose bằng lò vi sóng trong khoảng 3 - 4 phút, đảm bảo Agarose tan hoàn toàn.

+ Để nguội xuống 50 °C – 60°C rồi cho 10 µl Ethidium bromide lắc đều, đổ dung dịch Agarose này vào khuôn điện di có cài sẵn rãnh lược. Sau

khoảng 60 phút ở nhiệt độ phòng, khi bản thạch đã đông, gỡ nhẹ nhàng răng lược ra. Bảo quản thạch ở 4°C.

#### 4.2.4 Thực hiện phản ứng RT-PCR

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

- Cho 3 µl mẫu ARN bệnh phẩm vào hỗn hợp sinh phẩm đã chuẩn bị cho phản ứng RT-PCR.

- Cho các mẫu chứng vào tuýp tương ứng. Mẫu chứng dương cần được thao tác tại tủ An toàn sinh học cấp II.

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

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

**Bảng 7: Thông số chu trình nhiệt RT-PCR cúm**

	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp
Cúm A, cúm B, H1pdm09, A/H1, A/H3	50	30:00	1
	95	15:00	1
	94	0:30	} x 40
	50	0:30	
	72	0:40	
	72	7:00	1
	10	∞	
Cúm A/H5	50	30:00	1
	95	15:00	1
	94	0:30	} x 40
	55	0:30	
	72	0:30	
	72	7:00	1
	10	∞	
Cúm A/H7 NIID	50	30:00	1
	95	15:00	1
	94	0:30	} x 45
	50	0:30	
	72	1:00	
	72	7:00	1
	10	∞	

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

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

#### 4.2.5 Điện di sản phẩm RT-PCR

- Chuyển sản phẩm PCR vào thạch.

- Đặt thạch vào bể điện di theo đúng chiều dòng điện từ âm sang dương rồi cho TBE 1X ngập bản thạch sao cho dung dịch đậm cách mặt thạch từ 1-2mm.

- Cho 1 µl đậm đặt mẫu 6X (Loading Dye 6X) vào từng giếng của đĩa microtitre hoặc trên giấy parafilm với số lượng tương ứng với số mẫu cần phân tích.

- Trộn 9 µl mỗi sản phẩm PCR với 1µl đậm đặt mẫu 6X.

- Trộn 4 µl - 5 µl thang chuẩn ADN 100bp hoặc 1000 bp với 1µl đậm đặt mẫu X6.

- Chuyển dung dịch đã được trộn với nhau vào trong các giếng của bản thạch.

- Đóng nắp của bể điện di, chọn dòng điện 110V và thời gian 30 phút.

- Sau thời gian chạy máy điện di 30 phút, tắt máy điện di, chuyển thạch sang máy đọc.

- Soi và chụp ảnh: Đặt bản thạch ngay ngắn trên máy đọc, bật đèn tím để đọc bản thạch và chụp ảnh.

### 4.3. Tiến hành thực hiện chạy phản ứng realtime RT-PCR

#### 4.3.1 Sinh phẩm, hóa chất cho phản ứng realtime RT-PCR

- Thao tác được thực hiện tại tủ thao tác PCR phòng chuẩn bị dung dịch phản ứng. Sinh phẩm dùng trong phản ứng RT-PCR: SuperScrip™III Platium One-Step hoặc tương đương.

- Xếp các hoá chất, sinh phẩm cần sử dụng lên hộp tích lạnh theo thứ tự trong bảng pha dung dịch phản ứng.

- Đánh dấu tuýp 1,5 ml hoặc tuýp 0,5 ml dùng để trộn sinh phẩm và đặt lên hộp tích lạnh.

- Xác định số lượng phản ứng (N) cần làm:  $N = n + 1$  (với n: là tổng số mẫu xét nghiệm cộng với 1 chứng dương ARN).

- Xác định số lượng mẫu cần xét nghiệm (n) và pha hỗn hợp phản ứng cho tổng hợp cADN theo bảng sau:

**Bảng 8: Thành phần pha sinh phẩm cho phản ứng realtime RT-PCR**

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (µl)	Thể tích cho N phản ứng (µl)
1	2x Reagent mix		12,5	12,5 x N
2	Superscrip III RT/Platium Taq Mix		0,5	0,5 x N
3	Môi xuôi	40 µM	0,5	0,5 x N
4	Môi ngược	40 µM	0,5	0,5 x N
5	Probe	10 µM	0,5	0,5 x N
6	Nước cất 2 lần (Nuclease Free Water)		5,5	5,5 x N
<b>Tổng</b>			<b>20</b>	
7	ARN		5	
<b>Tổng</b>			<b>25</b>	

### 4.3.2 Chuẩn bị bộ môi cho phản ứng realtime RT-PCR

**Bảng 9: Trình tự các cặp môi và probe cho H1N1 cũ, H3N2 và H5N1**

Môi	Tên môi	Trình tự (5'-3')
Cúm A	Flu A xuôi	CAT GGA RTG GCT AAA GAC AAG ACC
	FluA ngược	AGG GCA TTT TGG ACA AAK CGT CTA
	Flu A đầu dò	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG
H3N2	H3HA xuôi	AAG CAT TCC YAA TGA CAA ACC
	H3HAngược	ATT GCR CCR AAT ATG CCT CTA GT
	H3 HA đầu dò	CAG GAT CAC ATA TGG GSC CTG TCC CAG
H5N1 -A	H5 HA xuôi	Xuất xứ từ CDC-USA
	H5 HA ngược	Xuất xứ từ CDC-USA
	H5 HA đầu dò	Xuất xứ từ CDC-USA
H5N1 -B	H5 HA xuôi	Xuất xứ từ CDC-USA
	H5 HA ngược	Xuất xứ từ CDC-USA
	H5 HA đầu dò	Xuất xứ từ CDC-USA
H7-A	H7 HA xuôi	Xuất xứ từ CDC-USA
	H7 HA ngược	Xuất xứ từ CDC-USA
	H7 HA đầu dò	Xuất xứ từ CDC-USA
Cúm B	Flu B xuôi	TCC TCA ACT CAC TCT TCG AGC G
	Flu B ngược	CGG TGC TCT TGA CCA AAT TGG
	Flu B đầu dò	CCA ATT CGA GCA GCT GAA ACT GAG GTG
RNP	RNP xuôi	AGA TTT GGA CCT GAG AGC G
	RNP ngược	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT
	RNP đầu dò	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG

- Trả lại nước khử ion theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đạt nồng độ gốc.

- Nồng độ môi sau đó được pha từ nồng độ gốc và tính theo đơn vị nmole (ghi trên tuýp môi đông khô).

- Chia ra các tuýp có thể tích 300 µl / 1 loại môi và bảo quản tại - 20°C.

### 4.3.3 Các bước tiến hành phản ứng realtime RT-PCR

- Chuẩn bị biểu mẫu kết quả xét nghiệm realtime RT-PCR.

- Cho 5µl mẫu ARN bệnh phẩm vào tuýp chứa hỗn hợp phản ứng realtime RT-PCR, ly tâm nhanh và giữ trong giá tích lạnh.

- Khi tra mẫu phải nhập mã số mẫu vào sơ đồ vị trí khung 96 giếng.

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

- Cài đặt chương trình cho máy realtime PCR.

**Bảng 10: Thông số chu trình nhiệt realtime RT-PCR cúm**

	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp
Cúm B, cúm A và phân týp	50	30:00	} x 1
	95	2:00	
A/H1 (cũ), A/H1p (09), A/H3, A/H5, A/H7	95	0:15	} x 45
	55	0:30	
	Thu tín hiệu huỳnh quang		
	20	∞	

- Khởi động chương trình theo yêu cầu xét nghiệm.
- Tạo tên tệp và lưu giữ dữ liệu.

**5. Phiên giải kết quả xét nghiệm****5.1. Đọc kết quả xét nghiệm:****5.1.1. Đọc kết quả xét nghiệm của phản ứng RT-PCR**

- Chứng dương: có dạng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế.

- Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): không có dạng đặc hiệu.

- Mẫu dương tính: sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước bằng kích thước chứng dương.

- Mẫu âm tính: là sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.

**Bảng 11: Kích thước sản phẩm PCR đặc hiệu**

Vi rút cúm và phân týp	Độ dài sản phẩm khuếch đại
A	244 bp
H1/09 đại dịch	349 bp
A/H1	120 bp
A/H3	120 bp
A/H5	219 bp
A/H7 NIID	284 bp
B	120 bp

**5.1.2. Đọc kết quả xét nghiệm của phản ứng realtime RT-PCR**

- Chứng âm: không có tín hiệu huỳnh quang, hoặc tín hiệu huỳnh quang sau chu kỳ thứ 40 của phản ứng.

- Chứng âm tách chiết: không có tín hiệu huỳnh quang.

- Chứng dương: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận theo thông tin trong tờ thông tin lô hàng đi kèm, thường nằm trong chu kỳ 20 - 30 của phản ứng.

- Mẫu dương tính: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 40 của phản ứng.

**5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm**

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



ứng âm tính mà chứng âm tách chiết dương tính thì làm lại từ khâu tách chiết. Kết quả không cho kết quả rõ ràng hoặc trong trường hợp cần khẳng định chính xác kết quả, phòng xét nghiệm có thể yêu cầu lấy lại bệnh phẩm và xét nghiệm theo thường quy của phòng từ bước nhận bệnh phẩm hoặc phòng xét nghiệm sẽ xét nghiệm bằng phương pháp còn lại.

- Kết quả được kết luận là dương tính nếu:

- + Mẫu chứng âm có kết quả âm tính
- + Mẫu chứng dương có kết quả dương tính
- + Mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính

- Kết quả được kết luận là âm tính nếu:

- + Mẫu chứng âm có kết quả âm tính
- + Mẫu chứng dương có kết quả dương tính
- + Mẫu bệnh phẩm có kết quả âm tính

- Kết quả không được phép kết luận nếu:

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

+ Mẫu chứng dương có kết quả âm tính với RT-PCR hay các mẫu chứng không có giá trị Ct rõ ràng với realtime RT-PCR.

### **5.3. Ghi chép và báo cáo**

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán Cúm.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## **IV. Tài liệu tham khảo**

1. CDC, Atlanta, Georgia, *Modern methods of influenza detection and subtyping*, April 25-29, 2005.

2. WHO global influenza surveillance network, *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*, 2011.

3. World Health Organisation, *Information for molecular diagnosis of influenza virus – update*, March 2014.

## **BỆNH RUBELLA**

**(Rubella)**

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

### **I. Mô tả chung**

Rubella là một bệnh truyền nhiễm, do vi rút Rubella gây nên. Vi rút Rubella thuộc giống *Rubivirus* của họ *Togaviridae*. Bệnh lưu hành trên toàn thế giới, thường xuất hiện vào mùa đông xuân, có thể xảy ra thành dịch.

Tuy bệnh Rubella là một bệnh lây nhiễm không nguy cấp (không gây nên biến chứng nguy hiểm, không gây chết người) như bệnh sởi (thường gây những biến chứng trầm trọng: viêm phổi, viêm phế quản, viêm não, viêm cơ tim, viêm tai giữa, rối loạn tiêu hóa...) nhưng lại khá nghiêm trọng do có khả năng gây nên những dị tật bẩm sinh nặng nề ở bào thai. Thai phụ mắc bệnh Rubella trong 3 tháng đầu của thai kỳ sẽ dễ bị những tai biến như sảy thai, thai chết trong tử cung hoặc gây nên những dị dạng cho thai nhi sau khi sinh như: các khuyết tật về tim, đục thủy tinh thể, điếc bẩm sinh, chậm phát triển trí tuệ...

Bệnh Rubella lây truyền qua đường hô hấp khi người lành: (1) Hít phải những giọt dịch tiết đường mũi họng (nước bọt, nước mũi) có chứa vi rút của người bệnh khi tiếp xúc trực tiếp mặt đối mặt với người bệnh; (2) Tiếp xúc với các vật dụng, các bề mặt (sàn nhà, bàn ghế, đồ chơi...) có dính chất tiết mũi họng của người bệnh. Người bị bệnh Rubella có thể lây truyền bệnh cho người khác một tuần trước khi phát ban và từ 1 đến 2 tuần sau khi ban đã lặn hết.

Chẩn đoán xác định bằng xét nghiệm hoặc có yếu tố dịch tễ liên quan đến ca xác định. Chẩn đoán phòng xét nghiệm bệnh Rubella được yêu cầu vì chẩn đoán lâm sàng thường không chính xác. Chẩn đoán xác định bệnh thường dựa trên (1) xét nghiệm phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu vi rút Rubella dương tính bằng kỹ thuật ELISA từ bệnh phẩm máu thu thập trong vòng 28 ngày sau phát ban, (2) hiệu giá kháng thể IgG kháng vi rút Rubella gia tăng gấp 4 lần trong máu kép, (3) phát hiện ARN vi rút Rubella bằng kỹ thuật RT-PCR và (4) phân lập vi rút Rubella trên nuôi cấy tế bào.

Phương pháp xét nghiệm huyết thanh học (IgM/IgG) được thực hiện ở tuyến tỉnh và khu vực. Các phương pháp xét nghiệm vi rút học và sinh học phân tử được thực hiện ở tuyến khu vực và quốc gia. Trong khuôn khổ tài liệu này, chỉ đề cập đến hai phương pháp xét nghiệm phát hiện kháng thể IgM bằng kỹ thuật ELISA và phát hiện ARN vi rút bằng kỹ thuật RT-PCR.

### **II. Yêu cầu chung**

#### **1. Nhân sự:**

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

- Tất cả nhân viên kỹ thuật xét nghiệm cần được đào tạo về sử dụng trang thiết bị, đào tạo về thực hành ATSH và thực hành vi sinh chuẩn, đào tạo về đảm bảo chất lượng xét nghiệm.

- Nhân viên phòng xét nghiệm được đào tạo các nội dung sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

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

- Được kiểm tra sức khỏe định kỳ tối thiểu 1 lần hàng năm; được tiêm vắc xin phòng bệnh Rubella và kiểm tra kháng thể IgG kháng vi rút Rubella hàng năm.

## **2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị**

### **2.1. Cơ sở vật chất:**

- Phòng xét nghiệm cần đáp ứng về điều kiện an toàn sinh học, hệ thống quản lý chất lượng phòng xét nghiệm theo quy định hiện hành.

- Các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán bằng ELISA và PCR thì thực hiện tại PXN ATSH cấp II trở lên.

- Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật RT-PCR cần 4 phòng xét nghiệm riêng, bao gồm: phòng pha dung dịch phản ứng (1), phòng tách chiết ARN (2), phòng đặt máy PCR(3) và phòng điện di (4). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) ⇒(2) ⇒ (3) ⇒ (4).

### **2.2. Trang thiết bị.**

**Bảng 1: Trang thiết bị**

<b>Tên thiết bị</b>	<b>Thiết bị cần dùng cho XN</b>	
	<b>ELISA</b>	<b>RT-PCR</b>
Dàn máy ELISA (máy ủ, máy rửa, máy đọc)	1 bộ	
Tủ lạnh 2-8°C, tủ âm -20°C, tủ âm – 80°C	1 cái	1 cái
Máy votex	1 cái	1 cái
Máy ly tâm thường	1 cái	1 cái
Micropi pét một kênh (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	1 bộ	1 bộ
Micropi pét đa kênh (8 hoặc 12 kênh) loại 25 µl – 300 µl.	1 bộ	1 bộ
Cốc đong 50 – 1000 ml	1 bộ	1 bộ
Tủ an toàn sinh học	1 cái	1 cái
Máy PCR		1 cái
Máy ly tâm lạnh	1 cái	1 cái
giá tích lạnh	1 cái	1 cái
Lò vi sóng		1 cái
Bộ điện di, máy chụp gel		1 bộ
Cân phân tích		1 cái

### **3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm**

#### **3.1. Trước xét nghiệm**

##### **3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu đầu vào**

- Mẫu máu từ 2 -3 ml trong tuýp không chứa chất chống đông: lấy tốt nhất từ 4 – 28 ngày sau phát ban, ly tâm lấy huyết thanh (không hoặc ít tan máu), bảo quản tại tủ lạnh 2°C - 8°C (tối đa 72 giờ) hoặc tủ lạnh - 20°C.

- Dịch ngoáy họng: lấy sớm trong vòng 5 ngày sau phát ban khi có viêm long đường hô hấp, cho tắm bông ngoáy họng trong môi trường (3 ml) bảo quản vi rút. Dịch ngoáy họng phải bảo quản tại tủ lạnh 2°C - 8°C (tối đa 72 giờ) hoặc tủ âm sâu (từ -70°C trở xuống).

- Trong quá trình vận chuyển giữ tại 2°C - 8°C, - 20°C, hoặc -70°C theo nhiệt độ bảo quản tương ứng.

- Kiểm tra chất lượng mẫu: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, chất lượng tốt, đủ thể tích mẫu cho xét nghiệm.

- Kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hay phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.1 của hướng dẫn này.

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

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

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

- Hóa chất sinh phẩm sử dụng trong xét nghiệm phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định của hóa chất/sinh phẩm.

- Hóa chất sinh phẩm khi nhận về phải được kiểm tra, đánh giá chất lượng.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

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

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

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

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

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

#### **3.2. Trong xét nghiệm**

##### **3.2.1. Nội kiểm**

a. Đối với xét nghiệm ELISA, ngoài các mẫu chứng theo sinh phẩm cần sử dụng mẫu nội kiểm độc lập.

b. Đối với kỹ thuật RT-PCR luôn sử dụng mẫu chứng trong mỗi lần xét nghiệm, trong đó:

- Chứng âm:

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

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

- Chứng dương: vi rút Rubella bất hoạt.

### **3.2.2. Đánh giá từ bên ngoài**

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

## **3.3. Sau xét nghiệm**

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

- Mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được cất vào hộp và lưu trong tủ lạnh sâu (từ -70°C trở xuống).

- Sau khi cất mẫu vào hộp nhân viên phòng xét nghiệm ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào Sổ lưu giữ mẫu.

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

- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

### **3.3.2. Tiêu hủy bệnh phẩm**

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:

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

- Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ

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

- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.

- Hấp ướt tại 121°C/30 phút.

- Sau khi hoàn tất, lấy túi rác thải và kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt.

- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.

## **4. Đọc và đánh giá kết quả:**

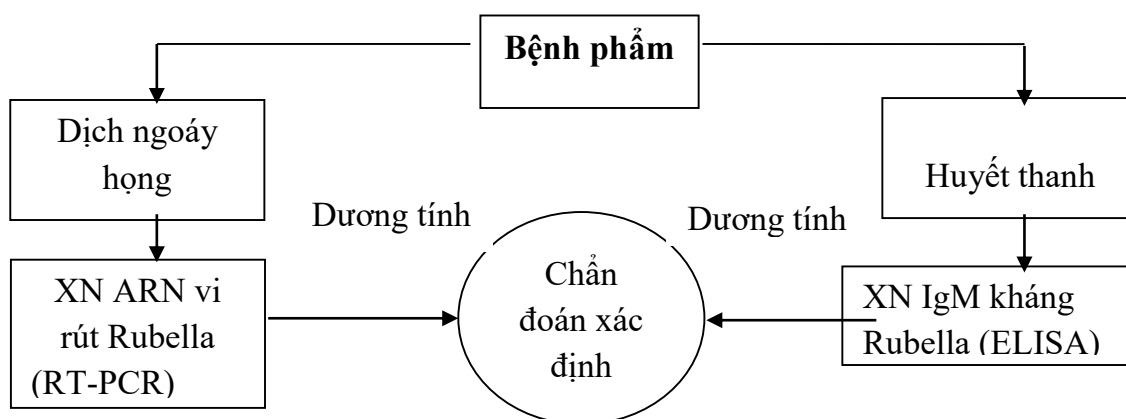
- Kết quả cần được kiểm giám sát và đánh giá bởi ít nhất 2 người và phải được lưu dưới dạng văn bản và trong máy tính.

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

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

**5. Thực hiện xác nhận lại giá trị sử dụng phương pháp xét nghiệm**  
Tham khảo mục 5, Phần II, Hướng dẫn xét nghiệm Bệnh cúm.

**III. Phương pháp xét nghiệm**



**Sơ đồ 1: Sơ đồ xét nghiệm Rubella**

**1. Xét nghiệm huyết thanh học phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu vi rút Rubella bằng kỹ thuật ELISA.**

**1.1. Phạm vi áp dụng**

Quy trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc chẩn đoán xác định kháng thể IgM kháng vi rút Rubella trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

**1.2. Nguyên lý**

Giếng ELISA được gắn sẵn kháng nguyên vi rút Rubella. Nếu huyết thanh bệnh nhân có kháng thể IgM kháng vi rút Rubella thì sẽ tạo phức hợp miễn dịch kháng nguyên – kháng thể. Cộng hợp gồm kháng IgM của người gắn enzym peroxidase sẽ kết hợp với kháng thể IgM đặc hiệu. Thành phần enzym trong cộng hợp làm xúc tác cho cơ chất chuyển sang màu xanh. Khi dung dịch dừng phản ứng được thêm vào, phản ứng dừng lại và dung dịch sẽ chuyển sang màu vàng.

**1.3. An toàn sinh học**

- Thao tác xét nghiệm phải tuân thủ quy định ở mức an toàn sinh học cấp 2.

- Dung dịch dừng phản ứng là chất gây bông nặng, không được cho nước vào dung dịch này

- Không được đổ các hóa chất thừa vào hệ thống nước thải sinh hoạt.

- Sử dụng trang phục bảo hộ cá nhân (áo choàng, khẩu trang, kính...)

trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

**1.4. Thực hiện xét nghiệm**

**1.4.1. Loại mẫu**

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh

- Thể tích bệnh phẩm dùng trong xét nghiệm: 10-50 µl

- Điều kiện bảo quản: 4°C (không quá 7 ngày), -20°C đến -70°C (trên 7 ngày).

- Huyết thanh lấy ở tủ âm phải để tan băng ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng

- Pha loãng mẫu huyết thanh theo tỉ lệ 1 + 20: 10 µl mẫu huyết thanh + 200 µl dung dịch pha loãng **DILUENT**.

- Thêm 210 µl dung dịch hấp phụ **RF ABSORBENT** vào mẫu huyết thanh đã pha loãng 1+20. Trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút hoặc ở 2°C - 8°C qua đêm.

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

- Sử dụng bộ sinh phẩm Enzygnost®Anti- Rubella/Virus IgM của hãng Siemens hoặc tương đương.

- Nước cất 2 lần khử ion (dùng để pha hóa chất và rửa máy rửa): 2 lít

- Găng tay, khẩu trang

- Đầu côn có lọc (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl); Đầu côn không lọc (200 µl và 1000 µl)

- Tube nhựa pha loãng mẫu 5 ml có nắp.

##### **a. Pha sinh phẩm**

- Bước 1: Để sinh phẩm ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút trước khi sử dụng.

- Bước 2: Pha loãng cộng hợp CONJUGATE/ANTI M với MICROBIOL/ M theo tỷ lệ 1/50.

- Bước 3: Pha loãng dung dịch rửa WASH/POD với nước cất 2 lần theo tỷ lệ 1/20.

- Bước 4: Pha loãng cơ chất CHROMOGEN/TMB với đệm SUBSTRATE/TMB theo tỷ lệ 1/10.

- Bước 5: Cho 5 ml nước cất vô trùng vào lọ RF ABSORBENT đông khô, lắc cho tan đều.

- Bước 6: Cho dung dịch tạo màu xanh COLOUR/BLUE vào dung dịch pha loãng mẫu DILUENT theo tỷ lệ 1/20.

##### **b. Chuẩn bị chứng**

Pha loãng chứng dương (P/P) và chứng âm (P/N) theo tỉ lệ 1+20: 400 µl dung dịch pha loãng (DILUENT) + 20 µl mẫu chứng.

#### **1.4.3. Các bước tiến hành**

- Bước 1: Lấy số giếng cần làm, thiết lập sơ đồ giếng cho chứng âm (P/N), 02 chứng dương (P/P1 và P/P2) và mẫu xét nghiệm tra vào ô trắng theo bảng bên dưới, mỗi mẫu cần tra 2 ô song song:

**Bảng 2. Sơ đồ tra mẫu**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P/N	P/N										
B	P/P1	P/P1										
C												
D												
E												
F												
G												
H											P/P2	P/P2

*\*Ghi chú: Phần ô trống điền thông tin mẫu*

- Bước 2: Cho 150 µl mẫu chứng âm (P/N), mẫu chứng dương (P/P) và mẫu huyết thanh theo sơ đồ đã chuẩn bị.

- Bước 3: Đậy kín phiến nhựa và ủ ở  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  trong  $60 \pm 2$  phút

- Bước 4: Rửa phiến nhựa 4 lần với dung dịch rửa đã pha loãng.

- Bước 5: Cho cộng hợp 100 µl dung dịch cộng hợp đã pha loãng vào mỗi giếng.

- Bước 6: Đậy kín phiến nhựa và ủ ở  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  trong  $60 \pm 2$  phút.

- Bước 7: Rửa phiến nhựa như bước 4.

- Bước 8: Cho 100 µl cơ chất đã pha loãng vào mỗi giếng.

- Bước 9: Đậy kín phiến nhựa. Ủ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối/30 ± 2 phút.

- Bước 10: Thêm 100 µl/giếng dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.

- Bước 11: Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng kép 450/650nm trong vòng 1 giờ.

### 1.5. Phiến giải kết quả xét nghiệm

#### 1.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm:

- Giá trị OD của các mẫu chứng cần phải đạt yêu cầu quy định như sau

- Giá trị chứng âm P/N:  $< 0.1$

- Giá trị chứng dương P/P:  $\geq 0.2$

- Nếu kết quả các mẫu chứng không thỏa những điều kiện trên phải làm lại phản ứng.

- Giá trị  $\Delta\text{OD P/N} < 0,1$

- Giá trị của  $\Delta\text{OD P/P1}$ ;  $\Delta\text{OD P/P2} \geq 2$

- Mỗi loạt sinh phẩm đều có 1 giá trị ngưỡng trên và ngưỡng dưới của chứng dương và được ghi rõ trong bảng các thông số kèm theo từng bộ sinh phẩm:

+ Ngưỡng dưới  $\leq \Delta\text{OD P/P1}$ ;  $\Delta\text{A}=\text{OD P/P2} \leq$  Ngưỡng trên  
(lower margin) (upper margin)

+  $\Delta\text{OD P/P}$  trung bình - 20%  $\leq \Delta\text{OD P/P1}$ ;  $\Delta\text{OD P/P2} \leq \Delta\text{OD P/P}$  trung bình + 20%.



### Tính toán kết quả

**Giá trị mẫu :  $\Delta A = \Delta OD$  X yếu tố hiệu chỉnh**

$\Delta OD = OD$  giếng gắn kháng nguyên –  $OD$  giếng không gắn kháng nguyên.

$$\text{Yếu tố hiệu chỉnh} = \frac{\text{Giá trị danh nghĩa (nominal value)}}{\text{Giá trị } \Delta OD_{P/P} \text{ trung bình}}$$

Giá trị danh nghĩa: đã cho sẵn trong bảng thông số đi kèm theo mỗi bộ sinh phẩm.

$$\Delta OD_{P/P} \text{ trung bình} = (\Delta OD_{P/P1} + \Delta OD_{P/P2}) / 2$$

#### **1.5.2. Nhận định kết quả**

- Mẫu âm tính khi  $\Delta A < 0,1$
- Mẫu dương tính khi  $\Delta A > 0,2$
- Mẫu nghi ngờ khi  $0,1 \leq \Delta A \leq 0,2$

#### **1.5.3. Ghi chép và báo cáo**

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

## **2. Phương pháp xét nghiệm RT-PCR phát hiện ARN của vi rút Rubella**

### **2.1. Phạm vi áp dụng**

Quy trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc xác định ARN của vi rút Rubella trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

### **2.2. Nguyên lý**

- ARN tổng số được tách từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi nhiễm vi rút Rubella. Sau đó, ARN được cho vào hỗn hợp RT-PCR với môi đặc hiệu với vi rút Rubella. Nhờ vào chu trình nhiệt và cặp môi đặc hiệu, phản ứng RT - PCR sẽ phiên mã ngược ARN thành cADN và sau đó khuếch đại số lượng cADN (ADN bổ sung) của vi rút Rubella thành hàng triệu bản sao. Các bản sao sẽ được phát hiện bằng kỹ thuật điện di.

- Nguyên tắc của phương pháp điện di dựa vào đặc tính cấu trúc của các nucleic acid. Đó là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác động của điện trường, chúng sẽ di chuyển về cực dương của điện trường. Các axit nucleic trong gel Agarose được quan sát dưới tia tử ngoại (UV) nhờ một hóa chất có tên là Ethidium bromide. Chất này có khả năng gắn xen vào giữa các base của các nucleic acid và dưới tác dụng của tia tử ngoại sẽ phát huỳnh quang.

- Sử dụng thang ADN chuẩn (DNA ladder) với kích thước đã biết trước để so sánh với mẫu chứng dương và mẫu cần phân tích. Kích thước sản phẩm của virus Rubella là 185 bp.

### 2.3. An toàn sinh học

- Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về an toàn sinh học theo quy định hiện hành đối với Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp II.

- Thuốc nhuộm ethidium bromide là một chất độc có thể gây ung thư cho người và động vật. Do đó, khi sử dụng hóa chất này phải mang găng tay và kính bảo hộ. Dung dịch sau khi sử dụng phải cho chảy qua than hoạt tính trước khi đổ bỏ hoặc có biện pháp xử lý chuyên biệt khác.

- Tham khảo các thuốc nhuộm khác an toàn như Sybr Green, GelRed, v.v.

### 2.4. Thực hiện xét nghiệm

#### 2.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút để tan băng (nếu để ở  $-80^{\circ}\text{C}$ ), trộn kỹ bằng máy vortex

- Tách chiết ARN tổng số theo hướng dẫn của bộ **QIAamp Viral RNA mini Kits** (tham khảo Mục 4.1.3, Phần III, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm).

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

- QIAGEN One step RT-PCR Kits, 100 phản ứng

- Găng tay không bột

- Đầu tip có lọc 2  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$

- Tuýp nhựa vô trùng 0,2 ml, 1,5 ml

##### a. Pha sinh phẩm

- Sử dụng tuýp PCR 0,2 ml

- Pha hỗn hợp master mix bao gồm: N = tổng số mẫu xét nghiệm + 1 mẫu chứng dương + 02 mẫu chứng âm + n (=1 nếu số mẫu XN <10; =2 nếu mẫu >10)

**Bảng 3. Sinh phẩm dùng cho phản ứng RT-PCR**

Sinh phẩm	Thể tích ( $\mu\text{l}$ )	Thể tích cho N phản ứng ( $\mu\text{l}$ )
QIAGEN 5X PCR Buffer (Dung dịch đệm)	4,0	4,0 x N
dNTPs (kit)	0,8	0,8 x N
MV 60 (20 $\mu\text{M}$ )	0,6	0,6 x N
MV 63-3(20 $\mu\text{M}$ )	0,6	0,6 x N
Enzyme mix (kit)	0,8	0,8 x N
Rnase Inhibitor	0,2	0,2 x N
Nước cất tinh sạch (kit)	11,0	11,0 x N
ARN mẫu	2,0	
Tổng số	<b>20</b>	

## b. Pha cập môi

**Bảng 4. Trình tự môi**

Tên môi	Trình tự nucleotid (5' – 3')
RV11 (môi xuôi)	CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC
RV12 (môi ngược)	CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA
RV12-2(môi ngược)	CCA <u>CGA</u> GCC GCG <u>AAC</u> AGT <u>CG</u>

- Trả lại nước khử ion theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đạt nồng độ gốc.

- Nồng độ môi sau đó được pha từ nồng độ gốc và tính theo đơn vị nmol (ghi trên tuýp môi đông khô).

- Cách hoàn nguyên môi:

$C_M = n/V$  Trong đó: V – thể tích nước cần hoàn nguyên

n – nồng độ gốc

$C_M$  – nồng độ cần hoàn nguyên

- Chia ra các tuýp có thể tích 300 $\mu$ l / 1 loại môi và bảo quản tại nhiệt độ -20°C.

### 2.4.3. Các bước tiến hành thực hiện phản ứng RT-PCR

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

- Cho 3  $\mu$ l mẫu ARN bệnh phẩm vào hỗn hợp sinh phẩm đã chuẩn bị cho phản ứng RT-PCR.

- Cho các mẫu chứng vào tuýp tương ứng. Mẫu chứng dương: được thực hiện tại tủ An toàn sinh học cấp II.

- Khởi động và kiểm tra chương trình trước khi chạy máy luân nhiệt cổ điển theo yêu cầu xét nghiệm.

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

**Bảng 5. Cài đặt chu trình nhiệt cho phản ứng PCR**

Bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút:giây)	Số chu kỳ
1	50	30:00	1
2	95	15:45	}40
3	94	0:30	
4	55	0:30	
5	72	01:00	
6	72	10:00	1
7	4	$\infty$	

Sau khi kết thúc quá trình luân nhiệt, tiến hành điện di sản phẩm và phân tích kết quả trên bản gel agarose và đọc trên máy chụp UV.

#### 2.4.4. Điện di sản phẩm RT-PCR

##### a. Sinh phẩm, hóa chất chạy điện di:

**Bảng 6. Sinh phẩm/hóa chất cho điện di sản phẩm sau RT-PCR**

Tên hóa chất	Nồng độ	Bảo quản
Agarose	1,5%.	Nhiệt độ phòng 15°C - 25°C
TAE 1X		Nhiệt độ phòng 15°C - 25°C
Ethidium Bromide 10mg/ml	5 – 10 µl/100 ml TAE 1X	Tủ lạnh 2°C - 8°C
Loading dye	2 -3 µl	Tủ lạnh 2°C - 8°C
Thang ADN chuẩn	5- 8 µl	Tủ lạnh 2°C – 8°C

##### b. Chạy điện di

- Chuyển sản phẩm PCR vào thạch.
- Đặt thạch vào bể điện di theo đúng chiều dòng điện từ âm sang dương rồi cho TBE 1X ngập bản thạch sao cho dung dịch đệm cách mặt thạch từ 1 - 2 mm.
- Cho 2 µl đệm đặt mẫu (Loading Dye) vào từng giếng của đĩa microtitre hoặc trên giấy parafilm với số lượng tương ứng với số mẫu cần phân tích.
- Trộn 8 µl - 10 µl mỗi sản phẩm PCR với 2 µl đệm đặt mẫu.
- Trộn 5 µl - 8 µl thang chuẩn ADN 100 bp hoặc 1.000 bp với 2 µl đệm đặt mẫu (nếu thang chuẩn ADN chưa có sẵn đệm đặt mẫu).
- Chuyển dung dịch đã được trộn với nhau vào trong các giếng của bản thạch.
- Đóng nắp của bể điện di, chọn dòng điện 110V và thời gian 30 phút.
- Tắt máy điện di, chuyển thạch sang máy đọc.
- Soi và chụp ảnh.
- Đặt bản thạch ngay ngắn trên máy đọc gel, bật đèn tím để đọc gel và chụp ảnh.

**Chú ý:** Do sản phẩm PCR nhạy với đèn tím nên hạn chế để bản thạch tiếp xúc với đèn tím. Ngay sau khi căn chỉnh và chụp được kết quả đẹp cần tắt ngay đèn tím.

#### 2.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

##### 2.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Chứng âm phản ứng: (NTC) nước cất không chứa nuclease (trong bộ sinh phẩm QIAGEN One step RT-PCR Kits) để kiểm tra ngoại nhiễm trong quá trình pha master mix, phải cho kết quả âm tính.
- Chứng âm tách chiết (NEC): mẫu tách chiết là môi trường vận chuyển và được tách chiết cùng mẫu bệnh phẩm: phải cho kết quả âm tính.
- Chứng dương virus Rubella: có dạng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi là 185bp.
- Nếu kết quả các mẫu chứng không thỏa những điều kiện trên phải làm lại phản ứng.

### **2.5.2. Nhận định kết quả**

#### **a) Kết quả được chấp nhận khi:**

- Chứng dương: có băng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế (185 bp)

- Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): âm tính.

- Mẫu âm tính: sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.

- Dương tính: sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước bằng kích thước chứng dương.

#### **b) Làm lại xét nghiệm khi có các trường hợp sau xảy ra**

- Chứng dương không có vạch đặc hiệu ở vị trí 185 bp: kiểm tra lại chứng dương và thực hiện lại phản ứng ở bước pha hỗn hợp master mix.

- Chứng âm master mix có vạch ở vị trí 185 bp: thực hiện lại phản ứng ở bước pha hỗn hợp master mix.

### **2.5.3. Ghi chép và báo cáo**

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán Rubella.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## **IV. Tài liệu tham khảo**

1. Quyết định số 4845/QĐ-BYT, ngày 5 tháng 12 năm 2012, *Hướng dẫn giám sát và phòng chống bệnh sởi, Rubella*.

2. Hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm Enzygnost® Anti-Measles virus/IgM của hãng Siemens.

3. Hướng dẫn sử dụng kit tách chiết “QIAamp® Viral RNA mini Kits” của hãng QIAGEN.

4. WHO, UNICEF và CDC (2012), *Global measles and Rubella strategic plan*, World Health Organization, United Nations Children's Fund, Switzerland, 43.

5. David L. Heymann (2015), *Control of communicable diseases manual*, 20th edition, p. 390.

# **BỆNH SỐT XUẤT HUYẾT DENGUE**

## **(Dengue)**

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

### **I. Mô tả chung**

Vi rút Dengue (DENV) thuộc chi *Flavivirus*, họ *Flaviviridae* với 4 týp huyết thanh DEN - 1, DEN - 2, DEN - 3 và DEN - 4. Vi rút Dengue gây bệnh Sốt Dengue (SD) / Sốt xuất huyết Dengue (SXHD) cấp tính do muỗi truyền và có thể gây thành dịch lớn.

Bệnh Sốt Dengue / Sốt xuất huyết Dengue là bệnh dịch lưu hành địa phương ở Việt Nam, nhất là ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long, đồng bằng Bắc bộ và vùng ven biển miền Trung. Do đặc điểm địa lý, khí hậu khác nhau, ở miền Nam và miền Trung bệnh xuất hiện quanh năm, ở miền Bắc và Tây Nguyên bệnh thường xảy ra từ tháng 4 đến tháng 11. Ở miền Bắc những tháng khác bệnh ít xảy ra vì thời tiết lạnh, ít mưa, không thích hợp cho sự sinh sản và hoạt động của muỗi *Aedes aegypti*. Bệnh SD/SXHD phát triển nhiều nhất vào các tháng 7, 8, 9, 10 trong năm.

Chẩn đoán xác định trong phòng thí nghiệm bằng phân lập/phát hiện vật liệu di truyền hoặc kháng nguyên vi rút trong máu trong vòng 5 ngày đầu kể từ khi sốt hoặc phát hiện kháng thể IgM kháng vi rút Dengue đặc hiệu trong huyết thanh từ sau ngày thứ 5.

### **II. Yêu cầu chung**

#### **1. Nhân sự**

Có ít nhất 02 cán bộ có chuyên môn phù hợp và đã được đào tạo về các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán sốt xuất huyết.

Cán bộ xét nghiệm được tập huấn an toàn sinh học và đảm bảo chất lượng trong phòng xét nghiệm.

Nhân viên phòng xét nghiệm cần được đánh giá năng lực định kỳ.

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

#### **2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị**

##### **2.1 Cơ sở vật chất:**

Phòng xét nghiệm cần đáp ứng về điều kiện an toàn sinh học, hệ thống quản lý chất lượng phòng xét nghiệm theo quy định hiện hành.

Các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán vi rút cúm được áp dụng cho phòng xét nghiệm hiện tại cấp II trở lên.

Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật RT-PCR cần 4 phòng xét nghiệm riêng, bao gồm: phòng pha dung dịch phản ứng (1), phòng tách chiết ARN (2), phòng đặt máy PCR(3) và phòng điện di (4). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) ⇒ (2) ⇒ (3) ⇒ (4).

Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật realtime RT-PCR cũng tương tự như RT-PCR, tuy nhiên không có phòng điện di.

## 2.2 Trang thiết bị

**Bảng 1. Trang thiết bị**

Tên thiết bị	Số lượng TB cần dùng/KTXN			
	XN nhanh	ELISA	RT-PCR	rRT-PCR
Máy ly tâm thường	01 máy	01 cái	01 cái	01 cái
Micropipette	01 bộ	01 bộ	03 bộ	03 bộ
Tủ lạnh bảo quản mẫu	01 cái	01 cái	01 cái	01 cái
Tủ lạnh bảo quản sinh phẩm	01 cái	01 cái	01 cái	01 cái
Tủ ATSH cấp 2		01 cái	01 cái	01 cái
Nồi hấp ướ		01 cái	01 cái	01 cái
Máy ly tâm nhỏ để bàn		02 cái	02 cái	02 cái
Máy ly tâm lạnh tốc độ tối đa 14 000 vòng/phút		01 cái	01 cái	01 cái
Máy vortex			02 cái	02 cái
Giá tích lạnh			02 cái	02 cái
Tủ thao tác PCR			01 cái	01 cái
Máy luân nhiệt PCR			01 cái	
Máy realtime PCR				01 cái
Máy ủ nhiệt			01 cái	01 cái
Máy làm đá vảy			01 cái	01 cái
Hệ thống máy điện di			01 bộ	
Lò vi sóng			01 cái	
Tủ lạnh âm sâu		01 cái	01 cái	01 cái
Tủ lạnh -20°C		01 cái	01 cái	01 cái

- Hồ sơ thiết bị gồm: hồ sơ xác nhận ban đầu của thiết bị, lý lịch thiết bị, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Cần có danh sách thiết bị, hướng dẫn sử dụng thiết bị.

- Đào tạo cho các nhân viên vận hành thiết bị theo đúng hướng dẫn.

### 3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm

#### 3.1 Trước xét nghiệm

##### 3.1.1 Đảm bảo chất lượng mẫu đầu vào

- Loại mẫu: mẫu máu, huyết thanh.

- Bảo quản: bảo quản bệnh phẩm tại nơi lấy mẫu ở 2°C - 8°C, trong vòng 72 giờ mẫu sẽ được chuyển tới PXN, nếu trong trường hợp bảo quản trên 72 giờ cần bảo quản tại nhiệt độ -70°C. Trong quá trình vận chuyển giữ tại 2°C - 8°C hoặc -70°C nếu bảo quản mẫu tại nhiệt độ -70°C.

- Kiểm tra chất lượng mẫu: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, chất lượng tốt, đủ thể tích mẫu cho xét nghiệm.

- Kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hay phiếu yêu cầu xét nghiệm.

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

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

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

### **3.1.3 Kiểm tra chất lượng hóa chất sinh phẩm & vật tư tiêu hao**

- Hóa chất sinh phẩm sử dụng trong phản ứng sinh học phân tử phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định của hóa chất/sinh phẩm.

- Hóa chất sinh phẩm khi nhận về phải được kiểm tra, đánh giá chất lượng.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

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

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

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

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

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

## **3.2 Trong xét nghiệm**

### **3.2.1 Nội kiểm**

- Đối với xét nghiệm nhanh cần thực hiện mẫu nội kiểm độc lập khi mở hộp.

- Đối với xét nghiệm ELISA, ngoài các mẫu chứng theo sinh phẩm cần sử dụng mẫu nội kiểm độc lập như xét nghiệm test nhanh.

- Đối với kỹ thuật RT-PCR và realtime RT-PCR luôn sử dụng mẫu chứng trong mỗi lần xét nghiệm, trong đó:

+ Chứng âm:

Chứng âm phản ứng (NTC): phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR hoặc/và realtime RT-PCR.

Chứng âm tách chiết (NEC): mẫu tách chiết là nước cất và được tách chiết cùng mẫu bệnh phẩm: phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR hoặc/và realtime RT-PCR.

+ Chứng dương: RNA vi rút Dengue (Đối với xét nghiệm phát hiện: phát hiện ra 1 trong 4 týp DEN; đối với xét nghiệm định týp: phát hiện ra cả 4 týp DEN).



### **3.2.2 Đánh giá từ bên ngoài**

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

### **3.3. Sau xét nghiệm**

#### **3.3.1 Bảo quản và lưu trữ bệnh phẩm**

- Mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được cất vào hộp và lưu trong tủ lạnh sâu (từ -70°C trở xuống).

- Sau khi cất mẫu vào hộp nhân viên phòng xét nghiệm ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào Sổ lưu giữ mẫu.

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

- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

#### **3.3.2. Tiêu hủy bệnh phẩm**

Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:

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

- Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ

Tiêu hủy mẫu bằng phương pháp hấp

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

- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.

- Hấp ướt tại 121°C/30 phút.

- Sau khi hoàn tất, lấy túi rác thải và kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt.

- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.

### **4. Đọc và đánh giá kết quả**

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

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

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

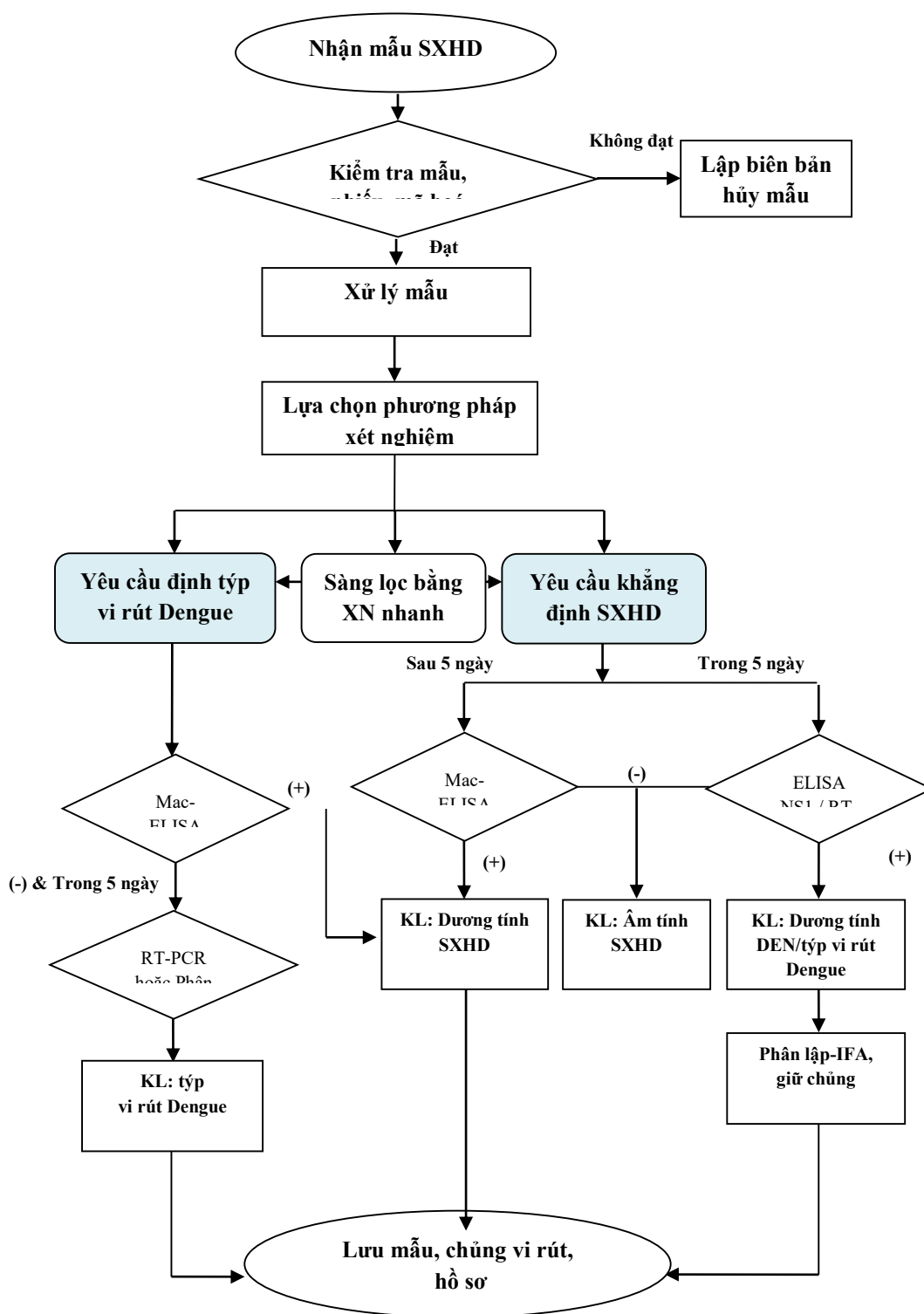
- Có quy định cụ thể cho trả kết quả cho các trường hợp thường quy, kết quả bất thường/ báo động, khẩn, tạm thời, và quy trình xử lý khi trả kết quả nhầm, chậm.

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

Tham khảo mục 5, Phần II, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm.

### III. Phương pháp xét nghiệm

Bệnh phẩm để làm xét nghiệm Sốt xuất huyết Dengue bao gồm xét nghiệm nhanh, xét nghiệm ELISA, xét nghiệm bán lồng RT-PCR và xét nghiệm realtime RT-PCR.



Sơ đồ 1: Sơ đồ xét nghiệm chẩn đoán và khẳng định SXHD.

## **1. Phương pháp xét nghiệm nhanh phát hiện kháng nguyên vi rút Dengue (NS1)**

### **1.1 Phạm vi áp dụng**

Phương pháp xét nghiệm nhanh phát hiện kháng nguyên vi rút Dengue (NS1) có thể áp dụng cho xét nghiệm sàng lọc trong chẩn đoán và giám sát vi rút tại phòng xét nghiệm của các cơ sở y tế đối với mẫu bệnh phẩm lấy trong vòng 5 ngày đầu sau khởi phát.

### **1.2 Nguyên lý**

Phương pháp này dựa trên nguyên lý màng miễn dịch sắc ký để phát hiện kháng nguyên không cấu trúc NS1 của vi rút Dengue. Dụng cụ thử là thanh giấy lọc có 2 vạch thử (T) và 1 vạch chứng (C). Tại vạch thử được gắn kháng thể đặc hiệu kháng NS1 và sử dụng một vạch chứng kiểm soát riêng nhằm đánh giá dòng chảy và hiệu suất của xét nghiệm.

Mẫu được tương tác với kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng NS1 liên hợp với các hạt nano vàng. Dung dịch sẽ di chuyển lên trên (thông qua hình thức mao dẫn) phản ứng kháng kháng thể NS1 trên màng. Nếu trong mẫu huyết thanh có sự hiện diện kháng nguyên NS1 thì sẽ xuất hiện vạch màu đỏ. Vạch màu đỏ xuất hiện tại vạch chứng kiểm soát luôn xuất hiện khi thực hiện xét nghiệm một cách chính xác.

### **1.3 An toàn sinh học**

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

### **1.4 Thực hiện xét nghiệm**

#### **1.4.1 Mẫu bệnh phẩm**

- Mẫu máu: từ 2 - 3ml.
- Mẫu huyết thanh: tối thiểu 1 – 1,5ml.
- Bệnh phẩm sau khi lấy xong phải được đưa ngay tới phòng xét nghiệm.

#### Tách huyết thanh đối với bệnh phẩm máu

- Sau khi lấy máu, để ổn định 30 phút và không quá 2 giờ ở nhiệt độ phòng, tiến hành tách huyết thanh/huyết tương. Trong trường hợp không tách được huyết tương/huyết thanh ngay sau khi lấy máu, để ổn định ở nhiệt độ phòng 30 phút sau đó bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C và cần phải tách huyết thanh ngay trong vòng 24 giờ.

- Sử dụng máy ly tâm phải thăng bằng các ống nghiệm trước khi ly tâm. Tiến hành ly tâm tốc độ 2000 - 2500 vòng/phút trong vòng 10 phút. Tách phần huyết thanh, huyết tương vào một ống nghiệm nhựa rồi đóng chặt nắp.

- Không có máy ly tâm: Để ống nghiệm trên giá trong 2 giờ, sau đó tách huyết thanh/huyết tương cho vào một ống nghiệm nhựa rồi đóng chặt nắp.

**Lưu ý:** Bảo quản mẫu huyết thanh ở 2 °C - 8°C trong vòng 7 ngày. Nếu chưa xét nghiệm ngay, bảo quản mẫu ở -20°C hoặc âm sâu hơn. Không làm tan mẫu quá 3 lần. Sau khi làm tan, phải trộn đều mẫu trước khi xét nghiệm.

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

- Bộ kit được bảo quản theo quy định của nhà sản xuất.
- Micropipette và tips phù hợp (20-200 µl).

#### **1.4.3 Các bước tiến hành**

Quy trình thực hiện có thể thay đổi tùy theo mỗi kit thương mại, cơ bản bao gồm các bước sau:

Đề mẫu xét nghiệm và mẫu nội kiểm đạt ở nhiệt độ phòng (trong khoảng 30 phút) trước khi xét nghiệm.

Chuẩn bị:

- Lấy số lượng test ứng với số lượng mẫu cần xét nghiệm, để ổn định ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút.
- Mở bao bì của test, dùng bút ghi mã số mẫu xét nghiệm lên từng test.
- Tra mẫu vào giếng xét nghiệm
- Dùng pipette hút 100 µl mẫu nhỏ vào giếng mẫu.
- Bấm đồng hồ 15 phút, đợi đọc kết quả sau 15 phút.

#### **1.5 Phân giải kết quả xét nghiệm**

##### **1.5.1 Đọc kết quả xét nghiệm**

- Chỉ đọc kết quả khi vị trí C có hiện vạch. Nếu vị trí C không có hiện vạch thì phải làm lại xét nghiệm với test khác.

- Mẫu có vạch ở vị trí C và có vạch ở vị trí T: Mẫu dương tính với kháng nguyên NS1Ag.

- Mẫu có vạch ở vị trí C và không có vạch ở vị trí T: Mẫu âm tính với kháng nguyên NS1Ag.

##### **1.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm**

- Mẫu dương tính: Có vạch ở vị trí C và T.
- Mẫu âm tính: Có vạch ở vị trí C và không có vạch ở vị trí T.

##### **1.5.3. Ghi chép và báo cáo**

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



## **2. Phương pháp xét nghiệm nhanh phát hiện kháng thể kháng vi rút Dengue (IgM, IgG)**

### **2.1 Phạm vi áp dụng**

Phương pháp xét nghiệm nhanh phát hiện kháng thể IgM, IgG sử dụng sinh phẩm Duo Cassette của hãng Panbio có thể áp dụng cho xét nghiệm sàng lọc trong chẩn đoán và giám sát vi rút tại phòng xét nghiệm của các cơ sở y tế.

## 2.2 Nguyên lý

Phương pháp xét nghiệm nhanh phát hiện kháng thể IgM, IgG kháng vi rút Dengue dựa trên nguyên lý miễn dịch sắc ký. Khi có mặt kháng thể sốt xuất huyết đặc hiệu IgM hoặc IgG trong mẫu bệnh nhân gắn với kháng thể kháng IgM hoặc IgG của người đã được cố định trên 2 vạch của thanh giấy lọc. Phức hợp keo vàng có chứa kháng nguyên tái tổ hợp Dengue 1-4 sẽ được gắn vào bởi IgM hoặc IgG sốt xuất huyết đặc hiệu của bệnh nhân sẽ xuất hiện vạch màu hồng. Có một vạch chứng để kiểm soát riêng quá thực hiện một cách chính xác.

Xét nghiệm này cho phép đánh giá gián tiếp sự nhiễm vi rút Dengue nguyên phát và thứ phát dựa vào sự phát hiện kháng thể IgM và IgG.

## 2.3 An toàn sinh học

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

## 2.4 Thực hiện xét nghiệm

### 2.4.1 Mẫu bệnh phẩm

- Mẫu máu: từ 2 - 3ml, mẫu huyết thanh/huyết tương: tối thiểu 1 – 1,5 ml.

- Mẫu sau khi lấy xong phải được đưa ngay tới phòng xét nghiệm.

- Tách huyết thanh đối với bệnh phẩm máu: thực hiện theo mục 1.4.1, Phần III tại hướng dẫn bệnh Sốt xuất huyết này.

**Lưu ý:** Bảo quản mẫu huyết thanh/huyết tương ở 2-8°C trong vòng 7 ngày. Nếu chưa xét nghiệm ngay, bảo quản mẫu ở -20°C hoặc âm sâu hơn. Không đông tan mẫu quá 3 lần. Sau khi làm tan, phải trộn đều mẫu trước khi xét nghiệm.

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

- Bộ kit được bảo quản theo quy định của nhà sản xuất.

- Micropipette và tip phù hợp (10 – 100 µl).

### 2.4.3 Các bước tiến hành

Quy trình thực hiện sử dụng sinh phẩm xét nghiệm nhanh Dengue Duo Cassette (Panbio) hoặc các kit tương đương. Để mẫu xét nghiệm và mẫu nội kiểm đạt ở nhiệt độ phòng (trong khoảng 30 phút) trước khi xét nghiệm.

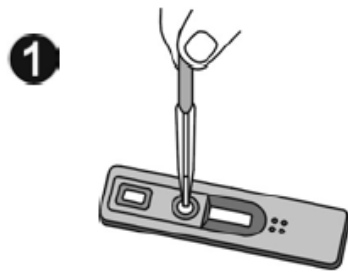
- Chuẩn bị:

+ Lấy số lượng test ứng với số lượng mẫu cần xét nghiệm, để ổn định ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút.

+ Mở bao bì của test, dùng bút ghi mã số mẫu xét nghiệm lên từng test.

- Tra mẫu xét nghiệm:

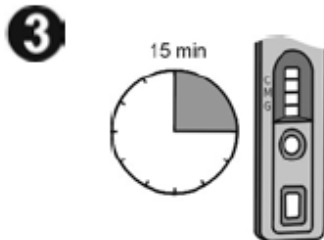
+ **Bước 1:** Nhỏ 10 µl máu toàn phần (hoặc huyết thanh, huyết tương) vào giếng tròn của dụng cụ thử nghiệm để mẫu thấm hoàn toàn vào giấy thấm bên dưới giếng tròn.



+ **Bước 2:** Nhỏ hai giọt dung dịch đệm vào giếng vuông của dụng cụ thử nghiệm. Lọ Dung dịch đệm phải ở tư thế thẳng đứng và cách xa giếng khoảng 1 cm.



+ **Bước 3:** Bấm đồng hồ 15 phút, đợi đọc kết quả sau 15 phút.



**Lưu ý:** trong trường hợp lấy mẫu máu khác:

- Nếu lấy mẫu máu đầu ngón tay thì phải tiến hành xét nghiệm ngay.

Các bước thực hiện như sau:

+ Dùng kim chích ở vị trí đầu ngón tay.

+ Dùng dụng cụ hút máu (cung cấp kèm với sản phẩm) kê sát vào giọt máu theo hướng nằm ngang để máu tự động chảy vào bên trong ống (khoảng 10 ml máu).

- Nếu mẫu máu toàn phần đã chứa trong ống nghiệm: Không cần dùng kim chích máu mà dùng trực tiếp dụng cụ hút máu (cung cấp kèm với sản phẩm) kê sát vào mẫu theo hướng nằm ngang để máu tự động chảy vào bên trong ống (khoảng 10 ml mẫu).

## 2.5 Phân giải kết quả xét nghiệm

### 2.5.1 Đọc kết quả xét nghiệm

- Sau khi xét nghiệm, nếu vạch gốc màu xanh vẫn còn hoặc vạch màu hồng không xuất hiện ở vị trí C thì mẫu xem như không được xác định và phải làm lại với test thử nghiệm khác.

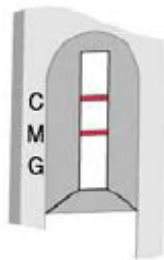
- C: Vị trí vạch kiểm chứng

- M: vị trí vạch dương tính IgM

- G: Vị trí vạch dương tính IgG

### 2.5.2 Nhận định kết quả xét nghiệm

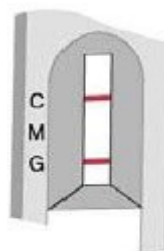
+ Nếu xuất hiện vạch ở vị trí C, và vị trí M, không xuất hiện vạch ở vị trí G thì mẫu dương tính với IgM Dengue và được đánh giá là nghiễm nguyên phát.



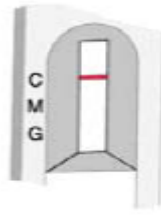
+ Nếu xuất hiện vạch ở vị trí C, vị trí M, và vị trí G thì mẫu dương tính với cả IgM và IgG Dengue và được đánh giá là nhiễm thứ phát.



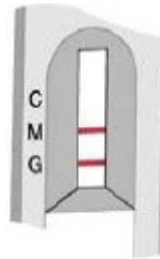
+ Nếu xuất hiện vạch ở vị trí C, và vị trí G, không xuất hiện vạch ở vị trí M thì mẫu dương tính với IgG Dengue và được đánh giá là nghiễm thứ phát.



+ Nếu xuất hiện vạch ở vị trí C, không xuất hiện vạch ở vị trí M và G thì mẫu âm tính với IgG Dengue và được đánh giá là không nhiễm vi rút Dengue.



+ Nếu không xuất hiện vạch ở vị trí C thì kết quả không được xác định, phải làm lại với dụng cụ thử nghiệm khác.



### 2.5.3. Ghi chép và báo cáo

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

## 3. Phương pháp xét nghiệm ELISA phát hiện kháng nguyên vi rút Dengue (NS1)

### 3.1 Phạm vi áp dụng

Phương pháp xét nghiệm này thường được áp dụng cho khẳng định tình trạng nhiễm DENV đối với mẫu bệnh phẩm lấy trong vòng 5 ngày đầu sau khởi phát.

### 3.2 Nguyên lý

Phương pháp xét nghiệm phát hiện kháng nguyên vi rút Dengue dựa trên nguyên lý ELISA, là phương pháp xét nghiệm trực tiếp có giá trị cao về mặt chẩn đoán.

Kháng nguyên Dengue NS1 trong huyết thanh (nếu có) của mẫu thử sẽ kết hợp với kháng thể kháng NS1 được phủ trên bề mặt polystyrene trong giếng của phiến nhựa. Lượng huyết thanh thừa được loại bỏ nhờ quá trình rửa và sau đó thêm vào cộng hợp HRP Anti-NS1 MAb. Sau khi ủ, các giếng được rửa và tiếp tục thêm dung dịch cơ chất không màu (TMB). Cơ chất sẽ được enzyme thủy phân chuyển sang màu xanh và chuyển sang màu vàng trong môi trường axit khi thêm dung dịch dừng phản ứng. Sự xuất hiện màu



giúp xác định có hiện diện của kháng nguyên Dengue NS1 trong mẫu xét nghiệm.

### **3.3 An toàn sinh học**

Tương tự như phương pháp xét nghiệm nhanh phát hiện kháng nguyên vi rút Dengue và bổ sung thêm yêu cầu về thực hiện trong phòng an toàn sinh học cấp II.

Axit sun phuríc trong dung dịch dùng phản ứng có tính ăn mòn và cần được sử dụng đúng cách. Nếu tiếp xúc với da hoặc mắt, rửa kỹ bằng nước.

### **3.4 Thực hiện xét nghiệm**

#### **3.4.1 Mẫu bệnh phẩm**

- Mẫu máu: từ 2 – 3 ml, mẫu huyết thanh/huyết tương: tối thiểu 1 – 1,5 ml.

- Mẫu sau khi lấy xong phải được đưa ngay tới phòng xét nghiệm.

**Lưu ý:** Bảo quản mẫu huyết thanh/huyết tương ở 2°C - 8°C trong vòng 7 ngày. Nếu chưa xét nghiệm ngay, bảo quản mẫu ở -20°C hoặc âm sâu hơn. Không đông tan mẫu quá 3 lần. Sau khi làm tan, phải trộn đều mẫu trước khi xét nghiệm.

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

- Sinh phẩm hóa chất được cung cấp theo kit:

+ Phiến nhựa (12 thanh x 8 giếng) có phủ kháng thể kháng thể kháng NS1.

+ Dung dịch cộng hợp (HRP Conjugated Anti-NS1 Mab), 15 ml

+ Dung dịch rửa (20X), 1 chai 60 ml với độ đậm đặc 20 lần của đệm muối phosphate (pH 7,2-7,6) với tween 20 và chất bảo quản (0,1% Prolin).

+ Dung dịch pha loãng mẫu (sample diluent), 1 chai 22 ml.

+ Dung dịch cơ chất (TMB), 1 chai 15 ml.

- Chứng dương – 1 tuýp 1,2 ml kháng nguyên tái tổ hợp.

- Chứng âm – 1 chai 1,2 ml huyết thanh người.

- Chất chuẩn – 1 chai 1,5 ml kháng nguyên tái tổ hợp.

- Dung dịch dừng – 1 chai 15 ml, dùng trực tiếp, 1M acid Phosphoric.

- Micropipette và tip tương ứng (20 µl -200 µl).

#### **3.4.3 Các bước tiến hành**

##### **a) Chuẩn bị:**

- Chuẩn bị tờ sơ đồ giếng tra mẫu, nồng độ khác nhau của các chất chuẩn tra vào ô CAL, chứng và mẫu nội kiểm tra vào các ô mẫu, các mẫu tiến hành xét nghiệm tra vào các ô trắng, mỗi mẫu cần tra 2 ô song song với nhau, như bảng dưới đây.

**Bảng 2. Sơ đồ tra mẫu**

N	Mẫu D										
P	Mẫu F										
CAL	Mẫu G										
CAL	Mẫu H										
CAL	Mẫu I										
Mẫu A	Mẫu J										
Mẫu B	Mẫu K										
Mẫu C	Mẫu L										

*\*Ghi chú: Phần ô trống điền thông tin mẫu*

+ Lấy số thanh giếng phù hợp với số mẫu cần xét nghiệm gắn vào khung. 5 giếng cần cho các chứng gồm 1 chứng âm (N), 1 chứng dương (P) và 3 chất chuẩn (CAL). Các giếng chưa sử dụng cần cho vào túi, dán kín miệng.

+ Chuẩn bị mẫu, chứng dương, chứng âm, chất chuẩn: sử dụng ống nghiệm riêng biệt để pha loãng mẫu bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm, chất chuẩn. Bằng cách cho 75µl dung dịch pha loãng vào 75µl mẫu, sau đó trộn đều.

#### **b) Thực hiện:**

- Nhỏ 100 µl mẫu và chứng đã được pha loãng ở trên vào các giếng tương ứng.

- Dán màng phủ lên phiến nhựa và ủ 1 giờ ở 37°C.

- Rửa 6 lần với dung dịch rửa đã pha loãng.

- Trộn đều dung dịch kháng nguyên-cộng hợp, nhỏ 100 µl kháng nguyên cộng hợp vào mỗi giếng.

- Dán phiến nhựa và ủ 1 giờ ở 37°C.

- Rửa 6 lần với dung dịch rửa đã pha loãng.

- Nhỏ 100 µl TMB vào mỗi giếng.

- Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng (20-25°C), tính giờ từ lúc nhỏ vào giếng đầu tiên. Màu xanh sẽ xuất hiện.

- Nhỏ 100µl dung dịch dừng vào tất cả các giếng, màu xanh sẽ chuyển sang màu vàng.

- Đọc kết quả trong vòng 30 phút với bước sóng đôi, 450nm – 600/650nm.

### **3.5 Phân giải kết quả xét nghiệm**

#### **3.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm**

- Tính giá trị ngưỡng (Cut off - CO): là giá trị trung bình của 3 chứng chuẩn x yếu tố hiệu chuẩn

-  $CO = (CAL_1 + CAL_2 + CAL_3) / 3 \times \text{YẾU TỐ HIỆU CHUẨN}$

- Tính giá trị chỉ số (Index V.): Giá trị Index = OD mẫu / CO

- Tính đơn vị PU (Panbio Unit):  $PU = \text{Giá trị Index} \times 10$

- Kết quả xét nghiệm

**Bảng 3. Đọc kết quả xét nghiệm**

Index V.	PU	Kết quả	Diễn giải
< 0,9	<9	Âm tính	Không phát hiện có kháng nguyên NS1 dengue. Kết quả này không chắc chắn bệnh nhân có nhiễm vi rút dengue hay không. Nên xét nghiệm lại bằng kỹ thuật huyết thanh học. Nếu kết quả âm tính và vẫn nghi ngờ thì cần kiểm tra lại bằng kỹ thuật huyết thanh học 1 lần nữa nhưng mẫu xét nghiệm không quá 14 ngày kể từ khi lấy mẫu ban đầu.
0,9 - 1,1	9 - 11	Nghi ngờ	Xét nghiệm lại, nếu vẫn nghi ngờ nên xét nghiệm bằng phương pháp khác.
> 1,1	> 11	Dương tính	Có phát hiện kháng nguyên NS1 dengue. Bệnh nhân bị nhiễm vi rút dengue, tuy nhiên nên làm thêm xét nghiệm huyết thanh học khác để khẳng định.

Ví dụ:

- Mẫu A có OD = 0,949; Mẫu B có OD = 0,070
- Trung bình của chứng chuẩn =  $(CAL_1 + CAL_2 + CAL_3)/3 = 0,802$ ; Yếu tố hiệu chuẩn = 0,62
- CO =  $0,802 \times 0,62 = 0,497$
- Mẫu A =  $0,949 / 0,497 = 1,91$  (Index value)  $\times 10 = 19,1$  Panbio Units.

Kết luận: Dương tính.

- Mẫu B =  $0,070 / 0,497 = 0,14$  (Index value)  $\times 10 = 1,4$  Pannio Units.

Kết luận: Âm tính.

### 3.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Xét nghiệm được kết luận là dương tính nếu:

- + Mẫu chứng âm có kết quả âm tính
- + Mẫu chứng dương có kết quả dương tính
- + Mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính

- Xét nghiệm được kết luận là âm tính nếu:

- + Mẫu chứng âm có kết quả âm tính
- + Mẫu chứng dương có kết quả dương tính
- + Mẫu bệnh phẩm có kết quả âm tính

- Xét nghiệm không được phép kết luận nếu:

- + Mẫu chứng âm có kết quả dương tính (nhiễm).
- + Các mẫu chứng không có OD rõ ràng.

### 3.5.3. Ghi chép và báo cáo

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

Khoa.

## **4. Phương pháp xét nghiệm ELISA phát hiện kháng thể IgM/ IgG virút Dengue**

### **4.1. Phạm vi áp dụng**

Phương pháp xét nghiệm theo kit Panbio dengue IgM Elisa cho phát hiện IgM và kit Panbio dengue IgG indirect Elisa cho phát hiện IgG có thể được áp dụng cho khẳng định tình trạng nhiễm vi rút Dengue tại phòng xét nghiệm của các cơ sở y tế.

### **4.2. Nguyên lý**

Phương pháp xét nghiệm phát hiện kháng thể IgM/ IgG kháng vi rút Dengue dựa trên nguyên lý miễn dịch phương pháp ELISA, là phương pháp xét nghiệm gián tiếp có giá trị cao về mặt chẩn đoán.

Với xét nghiệm phát hiện kháng thể IgM Dengue (nếu có) trong huyết thanh của mẫu thử sẽ kết hợp với kháng thể kháng IgM được phủ trên bề mặt polystyrene trong giếng của phiến nhựa. Lượng huyết thanh thừa được loại bỏ nhờ quá trình rửa. Sau đó, hỗn hợp kháng nguyên vi rút dengue (týp 1-4) và tiếp theo là cộng hợp các kháng thể đơn dòng tương ứng có gắn với enzyme peroxidase (HRP) sẽ được thêm vào.

Với xét nghiệm phát hiện kháng thể IgG Dengue (nếu có) trong huyết thanh của mẫu thử sẽ kết hợp với kháng nguyên vi rút dengue được phủ trên bề mặt polystyrene trong giếng của phiến nhựa. Lượng huyết thanh thừa được loại bỏ nhờ quá trình rửa. Sau đó, cộng hợp là các kháng thể kháng thể IgG người có gắn với enzyme peroxidase (HRP) sẽ được thêm vào.

Sau quá trình ủ, các giếng được rửa và tiếp tục thêm dung dịch cơ chất không màu (TMB). Cơ chất sẽ được enzyme thủy phân chuyển sang màu xanh và chuyển sang màu vàng trong môi trường axit khi thêm dung dịch dừng phản ứng. Sự xuất hiện màu chứng tỏ có sự hiện diện của kháng thể IgM Dengue hoặc IgG Dengue.

### **4.3. An toàn sinh học**

Theo Mục 3.3, Phần III, Hướng dẫn bệnh sốt xuất huyết này.

### **4.4. Thực hiện xét nghiệm**

#### **4.4.1. Mẫu bệnh phẩm**

Tương tự như phương pháp xét nghiệm ELISA phát hiện kháng nguyên NS1 kháng vi rút Dengue.

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

##### **a. Sinh phẩm cho xét nghiệm phát hiện IgM Dengue**

- Phiến nhựa (12 x 8 giếng) có phủ kháng thể kháng thể IgM người. Các thanh chưa dùng đến cần được bảo quản với túi hút ẩm, 2-8°C.

- Kháng nguyên tái tổ hợp Dengue 1 - 4, 150 µl/tuýp.

- Dung dịch pha loãng kháng nguyên (Antigen diluent), 1 chai 50 ml. Dùng trực tiếp, gồm đệm phosphate có chất bảo quản (0,1% Prolin và 0,005% gentamycin).

- Dung dịch cộng hợp kháng thể (HRP Conjugated Monoclonal Antibody tracer), 1 chai 7 ml, dùng trực tiếp. Bảo quản ở 2 - 8°C.

### **b. Sinh phẩm cho xét nghiệm phát hiện IgG Dengue**

- Phiến nhựa (12x8 giếng) có gắn kháng nguyên Dengue (típ 1, 2, 3, 4). Các giếng chưa dùng đến cần được bảo quản với túi hút âm, 2 - 8°C.

- Dung dịch cộng hợp kháng thể (HRP Conjugated Anti- human IgG), 1 chai 15 ml, dùng trực tiếp. Cộng hợp gắn enzyme peroxidase kháng IgG người sản xuất từ dê có bổ sung 0,1% chất bảo quản Proclin và chất ổn định protein. Bảo quản ở 2-8°C.

### **c. Sinh phẩm chung dùng trong bộ kit:**

- Dung dịch rửa (20X), 1 chai 60 ml với độ đậm đặc 20 lần của đệm muối phosphate (pH 7,2 - 7,6) với tween 20 và chất bảo quản (0,1% Prolin). Dung dịch rửa có thể bị kết tủa khi được giữ ở nhiệt độ thấp, có thể làm tan kết tủa khi ủ ở 37°C đến khi tan hết. Trộn đều. Pha loãng 1 phần dung dịch rửa và 19 phần nước. Dung dịch rửa đã pha loãng dùng được trong 1 tuần nếu bảo quản ở 20 - 25°C.

- Dung dịch pha loãng mẫu (sample diluent), 2 chai, 50 ml, dùng trực tiếp. Thành phần là đệm muối Tris (pH 7,2 - 7,6) với chất bảo quản (0,1% Proclin), bảo quản ở 2-8°C.

- Dung dịch cơ chất (TMB), 1 chai, 15 ml, dùng trực tiếp, là hỗn hợp của 3,3' và 5,5' tetranethylbenzidine và hydrogen peroxide trong đệm citrate (pH 3.5-3.8), bảo quản ở 2-8°C.

- Chứng dương – 1 tuýp 200 µl huyết thanh người (chứa 0,1% sodium azide và 0.005% gentamycine sulphate), bảo quản ở 2 °C - 8 °C.

- Chất chuẩn – 1 chai 400 µl huyết thanh người (chứa 0,1% sodium azide và 0.005% gentamycine sulphate), bảo quản ở 2 °C - 8 °C.

- Chứng âm – 1 chai 200 µl huyết thanh người (chứa 0,1% sodium azide và 0,005% gentamycine sulphate), bảo quản ở 2 °C - 8 °C.

- Dung dịch dừng – 1 chai 15 ml, dùng trực tiếp, 1M acid Phosphoric. bảo quản ở 2 °C - 8 °C.

### **4.4.3. Các bước tiến hành**

#### **a) Chuẩn bị:**

- Lấy số thanh tương ứng (1 thanh có 8 giếng) với số mẫu cần xét nghiệm gắn vào khung. 5 giếng cần cho các chứng gồm 1 chứng âm (N), 1 chứng dương (P) và 3 chất chuẩn (CAL). Các giếng chưa sử dụng cần cho vào túi, dán kín miệng.

- Chuẩn bị tờ sơ đồ giếng tra mẫu, nồng độ khác nhau của các chất chuẩn tra vào ô CAL, chứng và mẫu nội kiểm tra vào các ô mẫu, các mẫu tiến hành xét nghiệm tra vào các ô trắng, mỗi mẫu cần tra 2 ô song song với nhau, như bảng dưới đây.

**Bảng 4. Sơ đồ tra mẫu**

N	Mẫu D										
P	Mẫu F										
CAL	Mẫu G										
CAL	Mẫu H										
CAL	Mẫu I										
Mẫu A	Mẫu J										
Mẫu B	Mẫu K										
Mẫu C	Mẫu L										

*\*Ghi chú: Phần ô trống điền thông tin mẫu*

- Chuẩn bị mẫu, chứng, kháng nguyên và cộng hợp:

+ Sử dụng tuýp thích hợp để pha loãng chứng và mẫu của bệnh nhân: Hút 1.000 dung dịch pha loãng (DDPL), thêm vào 10 µl huyết thanh. Trộn đều.

+ Hoặc pha loãng theo cách: hút 90 µl DDPL, thêm 10 µl huyết thanh. Lấy 20 µl huyết thanh đã được pha loãng và thêm 180 µl DDPL, trộn đều.

Đối với xét nghiệm phát hiện IgM Dengue, cần thêm bước chuẩn bị dung dịch kháng nguyên-cộng hợp:

+ Pha loãng kháng nguyên 1/250 với dung dịch pha loãng kháng nguyên.

+ Sau đó thêm 1 phần thể tích dung dịch cộng hợp vào (tỷ lệ dung dịch kháng nguyên pha loãng: cộng hợp là 1:1). Trộn đều và để ở nhiệt độ phòng cho đến khi sử dụng.

Ví dụ: chuẩn bị kháng nguyên-cộng hợp cho 1 thanh (1 thanh có 8 giếng): (Hút 498 µl dung dịch pha loãng kháng nguyên + 2µl kháng nguyên + 500 µl cộng hợp, trộn đều).

**b) Thực hiện:**

Xét nghiệm phát hiện IgM Dengue

- Nhỏ 100 µl mẫu và chứng đã được pha loãng ở trên vào các giếng tương ứng.

- Dán màng phủ lên phiến nhựa và ủ 1 giờ ở 37°C.

- Rửa 6 lần với dung dịch rửa đã pha loãng.

- Trộn đều dung dịch kháng nguyên-cộng hợp, nhỏ 100 µl kháng nguyên-cộng hợp vào mỗi giếng.

- Dán phiến nhựa và ủ 1 giờ ở 37°C.

- Rửa 6 lần với dung dịch rửa đã pha loãng.

Xét nghiệm phát hiện IgG Dengue

- Nhỏ 100 µl mẫu và chứng đã được pha loãng ở trên vào các giếng tương ứng.

- Dán tấm plate và ủ 30 phút ở 37°C.

- Rửa 6 lần với DD rửa đã pha loãng.

- Nhỏ 100µl cộng hợp vào mỗi giếng.

- Dán tấm plate và ủ 30 phút ở 37°C.

- Rửa 6 lần với DD rửa đã pha loãng.

Sau đó tiến hành giống nhau với cả 2 xét nghiệm phát hiện IgM/ IgG

#### Dengue:

- Nhỏ 100µl TMB vào mỗi giếng.

- Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng (20-25°C), tính giờ từ lúc nhỏ vào giếng đầu tiên. Màu xanh sẽ xuất hiện.

- Nhỏ 100µl dung dịch dừng vào tất cả các giếng, màu xanh sẽ chuyển sang màu vàng.

- Đọc kết quả trong vòng 30 phút với bước sóng đôi, 450nm – 600/650nm.

#### **4.5 Phiên giải kết quả xét nghiệm**

Tương tự như mục 3.5 Phiên giải kết quả xét nghiệm của hướng dẫn này, các giá trị được tính theo công thức như trên và phiên giải theo giá trị index và PU để phát hiện IgM hoặc IgG tùy theo yêu cầu xét nghiệm.

### **5. Phương pháp xét nghiệm bán lồng RT-PCR (semi-nested RT-PCR) chẩn đoán và định týp vi rút Dengue**

#### **5.1 Phạm vi áp dụng**

Phương pháp xét nghiệm bán lồng RT-PCR áp dụng kỹ thuật khuếch đại đoạn gen có thực hiện quá trình phiên mã ngược được dùng để chẩn đoán và định týp vi rút Dengue, đóng vai trò nghiên cứu sâu hơn với những ca bệnh phức tạp.

#### **5.2 Nguyên lý**

RNA tổng số được tách chiết từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng nhiễm sốt xuất huyết Dengue và được phiên mã ngược thành cADN. Sau đó cADN được cho vào tuýp chứa dung dịch (dd) phản ứng PCR bao gồm cặp mồi đặc hiệu cho vi rút Dengue, enzyme Taq DNA polymerase, dNTPs... Tuýp phản ứng được đặt vào máy luân nhiệt PCR để khuếch đại đoạn trình tự đích theo chương trình nhiệt được cài đặt sẵn. Quá trình tổng hợp gồm khoảng 30-35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước chính: (i) bước biến tính ở nhiệt độ khoảng 94-95°C; (ii) bước gắn mồi ở nhiệt độ khoảng 50-55°C; và (iii) bước kéo dài ở nhiệt độ 72°C. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose để phát hiện sự có mặt hay không của đoạn gen đích đã được khuếch đại.

Sản phẩm PCR dương tính thu được từ phản ứng RT-PCR phát hiện vi rút Dengue sẽ được làm khuôn cho phản ứng bán lồng PCR. Ở phản ứng bán lồng PCR, các mồi ngược (TS1, TS2, TS3, TS4) đặc hiệu cho từng týp huyết thanh của vi rút Dengue (D1, D2, D3, D4) được cho vào cùng với mồi xuôi D1 sẽ khuếch đại sản phẩm PCR với kích thước khác nhau cho từng loại týp huyết thanh. Xác định týp huyết thanh của vi rút Dengue dựa vào kết quả điện di sản phẩm PCR.

#### **5.3 An toàn sinh học**

- Mang găng tay và mặc áo khoác khi tiến hành thao tác.

- Sử dụng các thiết bị (tủ ATSH, máy PCR, ly tâm...) theo đúng hướng dẫn.

- Lau chùi pipet man, giá tích lạnh và bề mặt làm việc sau khi làm việc bằng cồn và khử nhiễm tử ATSH bằng đèn cực tím trước và sau khi làm việc trong 15 phút.

#### **5.4 Thực hiện xét nghiệm**

Phương pháp xét nghiệm thực hiện gồm 2 bước: bước 1 phát hiện virút Dengue, bước 2 định tít vi rút Dengue. Trong đó:

Bước 1 sử dụng bộ môi xuôi D1 và môi ngược D2 được thiết kế để phát hiện chung các vi rút Dengue,

Bước 2 chỉ sử dụng môi xuôi (D1) và 4 môi ngược (TS1, TS2, TS3, TS4) đặc hiệu riêng cho 4 kiểu gen của vi rút Dengue.

##### **5.4.1. Mẫu bệnh phẩm**

- Sử dụng mẫu huyết thanh, huyết tương hoặc máu toàn phần (tuýp chứa thành phần chống đông EDTA). Với yêu cầu tách huyết thanh, tham khảo phần tách huyết thanh mục 1.4.1 hướng dẫn xét nghiệm bệnh này.

- Yêu cầu mẫu không bị tán huyết, vón cục, tạp nhiễm.

- Thẻ tích huyết thanh/huyết tương gửi đến phòng xét nghiệm cần đạt tối thiểu 500 µl, máu toàn phần tối thiểu là 1ml.

- Bảo quản mẫu huyết thanh ở 2-8°C trong vòng 2 ngày. Nếu chưa xét nghiệm ngay, bảo quản mẫu ở -70°C trở xuống. Không rã đông mẫu quá 3 lần. Sau khi làm tan, phải trộn đều mẫu trước khi xét nghiệm.

- Tách chiết ARN theo hướng dẫn của bộ QIAamp Viral RNA Kits (tham khảo Mục 4.1.3, Phần III, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm).

##### **5.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao**

###### **a) Danh mục sinh phẩm, hóa chất, chứng, môi**

- AMV Reverse Transcriptase 600U (25U/µl)

- Đệm 5X

- Rnasin (10.000 U, 40 U/µl)

- dNTP mix 5mM

- GoTaq® Flexi DNA Polymerase

- Nước tinh sạch (Nuclease free water)

- Ultrapure Agarose

- 100 bp DNA ladder

- Axit Bo ríc

- Tris Base

- EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, 2Na)

- SyBR Safe 10.000 X

- Đệm đặt mẫu 6X (Loading dye 6X)

- QIAamp Viral RNA Mini Kit

- Ethanol (96-100%).

- Mẫu chứng:

+ Chứng âm (NC): là nước tinh sạch dùng cho phản ứng PCR (làm chứng cho bước chuẩn bị dd phản ứng).

+ Chứng âm tách chiết (Mo): là mẫu chiết tách từ nước tinh sạch (dùng làm chứng cho bước chiết tách).



- + Chứng dương (PC): là RNA vi rút Dengue và các týp D1, D2, D3, D4.
- Môi sử dụng cho phản ứng PCR

**Bảng 5. Trình tự môi xuôi D1 và các môi ngược D2, TS1 – TS4**

Tên môi	Trình tự nucleotid (5' – 3')
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC
TS1	CGT CTC AGT GAT CCG GGG G
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA

**b) Pha sinh phẩm/hóa chất cho các phản ứng**

Thao tác được thực hiện tại tủ thao tác PCR trong phòng chuẩn bị dung dịch phản ứng.

- Pha dung dịch phản ứng cho tổng hợp cADN
- + Xếp các hoá chất, sinh phẩm cần sử dụng lên hộp tích lạnh theo thứ tự trong bảng pha dung dịch phản ứng (xem Phụ lục 1)
- + Đánh dấu tuýp 1,5 ml hoặc tuýp 0,5 ml dùng để trộn sinh phẩm và đặt lên hộp tích lạnh.
- + Xác định số lượng phản ứng (N) cần làm:  $N = n + 1$  (với n: là tổng số mẫu xét nghiệm cộng với 1 chứng dương ARN). Lưu ý: Có thể sử dụng 1 trong 4 loại chứng dương ARN D1, D2, D3, D4 để làm chứng cho phản ứng tổng hợp cADN.
- + Xác định số lượng mẫu cần xét nghiệm (n) và pha hỗn hợp phản ứng cho tổng hợp cADN theo bảng sau:

**Bảng 6. Sinh phẩm cho phản ứng tổng hợp cADN**

Sinh phẩm	Thể tích (µl)	Thể tích cho N phản ứng (µl)
Nước tinh sạch	7,3	7,3 x N
Đệm RT 5X	4	4 x N
dNTPs (5mM)	2	2 x N
Môi D2 (10µM)	1	1 x N
Rnasine (40 U/µl)	0,5	0,5 x N
AMV (Promega)	0,2	0,2 x N
<b>Tổng</b>	<b>15</b>	

- + Trộn dung dịch phản ứng bằng vortex, ly tâm nhanh khoảng 3-5 giây và chuyển sang phòng chiết tách ARN/ADN, giữ ở 2-8°C cho đến khi sử dụng.
- + Ghi thông tin vào Phiếu pha dung dịch phản ứng cho xét nghiệm SXHD bằng kỹ thuật RT-PCR (xem Phụ lục 1). Rnasin và AMV Reverse transcriptase nên cho cuối cùng vào tuýp.

- Pha dung dịch phản ứng cho RT-PCR Dengue/ bán lỏng RT-PCR Dengue

+ Xếp các hoá chất, sinh phẩm cần sử dụng lên hộp tích lạnh theo thứ tự trong bảng pha dung dịch phản ứng (xem Phụ lục 1)

+ Đánh dấu tuýp 1,5 ml hoặc tuýp 0,5 ml dùng để trộn sinh phẩm và đặt lên hộp tích lạnh.

+ Chuẩn bị tuýp hoặc dây tuýp PCR 0,2 ml, đánh dấu mã bệnh phẩm và đặt vào hộp đựng. Ghi tên phản ứng, và ngày thực hiện lên nắp hộp.

+ Xác định số lượng phản ứng (N) cần làm:  $N = n + 1$

Đối với phản ứng PCR Dengue:  $n =$  số mẫu + 1 chứng dương RNA + 1 chứng dương cADN + 1 chứng âm + 1 chứng mock

Đối với phản ứng SN Dengue:  $n =$  số mẫu + 4 chứng dương D1, D2, D3, D4 + 1 chứng âm

Tuỳ vào phản ứng phát hiện hay định tít vi rút Dengue, pha hỗn hợp dung dịch phản ứng như sau:

+ Pha theo bảng pha dung dịch phản ứng cho phát hiện Dengue (RT-PCR Dengue) (xem Phụ lục 1), lượng sinh phẩm được tính như bảng bên dưới đây.

**Bảng 7. Sinh phẩm cho phản ứng RT-PCR**

Sinh phẩm	Thể tích (µl)	Thể tích theo số lượng phản ứng (N)
Nước không chứa nucleaza (NFW)	12,8	12,8 x N
Đệm 5X Go Taq	5,0	5,0 x N
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,5	2,5 x N
dNTPs (5mM)	1	1 x N
Môi D1 (10µM)	0,5	0,5 x N
Môi D2 (10µM)	0,5	0,5 x N
Go Taq Flexi DNA Polymerase	0,2	0,2 x N
<b>Tổng</b>	<b>22,5</b>	<b>22,5 x N</b>

Sử dụng chứng dương ARN tổng hợp thành cADN, và một chứng dương cADN đã sản xuất sẵn để làm chứng dương cho phản ứng PCR phát hiện vi rút Dengue.

- Pha theo Bảng dung dịch phản ứng bán lỏng RT-PCR Dengue để định tít vi rút Dengue (xem Phụ lục 1). Sinh phẩm sử dụng cho phản ứng bán lỏng RT-PCR như bảng dưới đây:

**Bảng 8. Sinh phẩm cho phản ứng bán lỏng RT-PCR**

Sinh phẩm	Thể tích (µl)	Thể tích theo số lượng phản ứng (N)
Nước tinh sạch	11,3	11,3 x N
Đệm RT 5X Go Taq	5,0	5,0 x N
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,5	2,5 x N

Sinh phẩm	Thể tích (µl)	Thể tích theo số lượng phản ứng (N)
dNTPs (5mM)	1	1 x N
Môi D1 (10µM)	0,5	0,5 x N
Môi TS1 (10µM)	0,5	0,5 x N
Môi TS2 (10µM)	0,5	0,5 x N
Môi TS3 (10µM)	0,5	0,5 x N
Môi TS4 (10µM)	0,5	0,5 x N
Go Taq Flexi DNA Polymerase	0,2	0,2 x N
<b>Tổng</b>	<b>25</b>	

Sử dụng cả 4 loại chứng dương (D1, D2, D3, D4) để làm chứng cho phản ứng bán lồng PCR định tít vi rút Dengue.

- Trộn đều hỗn hợp phản ứng (bằng pipette hoặc vortex nhẹ); ly tâm nhanh (1-3 giây) và đặt vào giá tích lạnh.

- Chia dung dịch phản ứng đã trộn (theo thể tích tổng số của từng loại phản ứng) vào từng tuýp hoặc dây tuýp PCR đã chuẩn bị, đậy nắp.

- Cho 2,5 µl nước tinh sạch vào tuýp chứng âm.

- Ghi thông tin vào Phiếu pha dung dịch phản ứng cho xét nghiệm SXHD bằng kỹ thuật RT-PCR (Phụ lục 1).

- Các tuýp/dây tuýp đựng dung dịch phản ứng được giữ trên giá tích lạnh và chuyển đến phòng chiết tách RNA để cho mẫu và chứng.

#### 5.4.3. Tổng hợp cADN

- Chuẩn bị tuýp 1,5 ml có nắp kẹp gioăng cao su (để tránh thoát hơi khi ủ nhiệt) với số lượng tương ứng với số mẫu, và một chứng dương. Ghi mã số mẫu và chứng lên tuýp. Bật máy ủ nhiệt, chỉnh nhiệt độ 42°C.

- Phân 15 µl hỗn hợp dung dịch phản ứng vào mỗi tuýp.

- Tiếp tục cho 5 µl mẫu RNA vào (lưu ý đúng mã số), trộn đều bằng pipet.

- Ly tâm nhanh (1-3 giây) và ủ các tuýp ở máy ủ nhiệt 42°C trong 1 giờ.

- cADN tổng hợp được giữ ở 2-8°C trong vòng 7 ngày nếu sử dụng ngay, nếu không giữ ở nhiệt độ từ -20°C đến -30°C.

#### 5.4.4. Các bước tiến hành thực hiện phản ứng PCR

- Cho mẫu vào dung dịch phản ứng PCR Dengue (thực hiện trong tủ ATSH cấp II, phòng chiết tách axit nucleic):

+ Chuyển các tuýp/ dây tuýp đựng dung dịch phản ứng sang phòng chiết tách để cho mẫu.

+ Cho 2,5 µl mẫu xét nghiệm cADN đã tổng hợp vào tuýp hoặc giếng trong dây tuýp đúng theo mã số mẫu đã ghi.

+ Tương tự, cho 2,5 µl cADN chứng dương vào tuýp chứng dương.

+ Cho 2,5 µl nước tinh sạch vào tuýp chứng âm (thực hiện trong lúc chuẩn bị dung dịch phản ứng).

- + Đóng nắp tuýp/ dây tuýp ngay sau khi cho mẫu và chuyển sang phòng máy PCR.
- Chạy máy PCR, khuếch đại DNA đích tạo sản phẩm PCR
- + Thao tác thực hiện tại phòng máy PCR
- + Vận hành máy PCR.
- + Ly tâm nhanh các tuýp/ dây tuýp mẫu khoảng 3-5 giây rồi đặt vào máy PCR, đậy nắp máy.
- + Chạy máy theo chu trình nhiệt như bên dưới

**Bảng 9. Cài đặt chu trình nhiệt cho phản ứng RT-PCR**

Bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút:giây)	Số chu kỳ
Bất hoạt RT/hoạt hóa Taq	95	05:00	1
Biến tính	95	0:45	} 35
Gắn mồi	50	0:45	
Kéo dài	72	01:00	
Kéo dài và hoàn chỉnh DNA	72	05:00	1
Giữ	4	∞	

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

- + Ghi nhật ký sử dụng thiết bị.

#### **5.4.5. Điện di sản phẩm PCR**

##### **a) Chuẩn bị gel Agarose**

##### Chuẩn bị dung dịch đệm TBE 10X

- Dung dịch EDTA 0,5M, pH8

+ EDTA, 2Na 93,05g

+ Nước cất 350ml

+ Hòa tan EDTA trong nước, dùng NaOH 4M chỉnh pH = 8

+ Thêm nước cất cho đủ 500ml

+ Hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C/20 phút

+ Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- Dung dịch đệm TBE 10X

+ Tris Base 108g

+ Boric acid 55g

+ Nước cất 600ml

+ Hòa tan Tris Base và Boric acid trong nước

+ Thêm EDTA 0.5M, pH8 20ml

+ Thêm nước cất cho đủ 1.000ml

+ Kiểm tra pH trong khoảng 8 – 8.3; nếu pH ngoài khoảng này thì phải pha lại, không chỉnh pH bằng hóa chất vì sự thay đổi nồng độ ion sẽ ảnh hưởng đến sự di chuyển của DNA trong bản thạch khi điện di.

Hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C/20 phút

+ Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

### Chuẩn bị dung dịch đệm TBE 1X

Khi sử dụng lấy 100ml TBE 10X pha vào 900ml nước cất thành dung dịch TBE 1X, bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Các chai dung dịch đệm được dán nhãn theo quy định.

### Thạch điện di (Agarose 2%)

- Chuẩn bị khuôn gel, dán hoặc bịt kín hai đầu khuôn bằng băng keo, cài răng lược (chọn loại lược phù hợp). Khuôn thạch phải đặt trên mặt bàn bằng phẳng.

- Cân 2g agarose bột cho vào chai Duran/bình cầu (chịu nhiệt) có 100ml TBE 1X. Nấu agarose bằng lò vi sóng trong khoảng 3-4 phút để agarose tan hoàn toàn.

- Để dung dịch agarose nguội xuống khoảng 50°C rồi cho 13 $\mu$ l SyBR safe, lắc nhẹ để trộn đều, đổ dung dịch agarose này vào khuôn đổ thạch có cài sẵn răng lược (tránh không tạo bọt khí khi đổ). Để nguội ở nhiệt độ phòng cho đến khi thạch đông lại, gỡ bỏ băng keo bịt hai đầu khuôn, gỡ nhẹ nhàng răng lược ra. Bản thạch được sử dụng ngay hoặc giữ ở 2-8°C, tránh ánh sáng, dùng trong tuần.

### **b) Tiến hành điện di**

- Ly tâm nhanh các tuýp/dây tuýp sản phẩm PCR khoảng 3-5 giây để tập trung sản phẩm PCR xuống đáy tuýp.

- Đặt khuôn thạch vào bể điện di theo đúng chiều dòng điện từ âm (đen) sang dương (đỏ). Cho dung dịch TBE 1X vào ngập bản thạch sao cho dung dịch đệm cách mặt thạch từ 1-2 mm.

- Cho 2 $\mu$ l đệm đặt mẫu 6X lên giấy parafilm sao cho tránh sự lây nhiễm giữa các mẫu. Số lượng giọt tương ứng với số mẫu cần phân tích (đệm đặt mẫu 6X chứa 50% Glycerol vì vậy có tác dụng kéo DNA xuống dưới đáy giếng trên bản thạch và còn chứa Bromophenol Blue có tác dụng đánh dấu DNA trong quá trình chạy).

- Trộn 9 $\mu$ l mỗi sản phẩm PCR với 2 $\mu$ l đệm đặt mẫu 6X trên giấy parafilm và cho vào các giếng của bản thạch (gồm mẫu thử, mẫu chứng dương và âm tính).

- Cho 6 $\mu$ l thang chuẩn DNA 100 bp vào giếng.

- Đóng nắp bể điện di, kết nối điện cực của bể điện di với máy chỉnh nguồn điện, chọn hiệu điện thế 120V và thời gian 30 phút.

- Sau khi đủ thời gian chạy, tắt nguồn điện, mở nắp, chuyển thạch sang buồng chụp ảnh gel và tiến hành chụp ảnh:

+ Mở máy tính được kết nối với máy chụp ảnh điện di. Đặt bản thạch ngay ngắn trên bàn đặt gel, đóng cửa buồng đặt gel, bật đèn cực tím để đọc kết quả điện di sản phẩm PCR và chụp ảnh. Kết quả hiển thị trên máy vi tính kết nối hoặc trên màn hình của máy đọc gel.

+ Đánh mã số cho giếng chứng dương, chứng âm và các mẫu bệnh phẩm tương ứng với các giếng, lưu vào máy tính và in kết quả.

+ Sản phẩm PCR có thể giữ ở 2-8°C trong 1 tuần, nếu cần giữ lâu hơn thì bảo quản ở -20°C đến -30°C.

#### 5.4.6. Các bước tiến hành thực hiện phản ứng bán lồng PCR định tít vi rút Dengue

Thực hiện đối với các mẫu dương tính đối ở bước RT- PCR Dengue. Sản phẩm PCR sẽ được làm khuôn cho phản ứng bán lồng RT-PCR định tít vi rút Dengue.

- Cho mẫu vào dung dịch phản ứng bán lồng PCR PCR định tít vi rút Dengue (thực hiện trong tủ ATSH cấp II, phòng chiết tách):

+ Chuyển các tuýp/ dây tuýp đựng dung dịch phản ứng sang tủ thao tác PCR tại phòng máy PCR để cho mẫu.

+ Cho 2,5 µl sản phẩm PCR dương tính ở bước 3 vào tuýp hoặc giếng trong dây tuýp đúng theo mã số mẫu đã ghi. Lưu ý: tùy theo mức độ đậm/nhạt của vạch dương tính trên hình điện di ở bước 3 có thể pha loãng sản phẩm PCR trong nước cất theo tỷ lệ 1/25, 1/50, 1/100.

+ Tương tự, cho 2,5 µl chứng dương vào tuýp chứng dương.

+ Cho 2,5 µl nước tinh sạch vào tuýp chứng âm (thực hiện trong lúc chuẩn bị dung dịch phản ứng).

+ Đóng nắp tuýp/ dây tuýp, ly tâm nhanh khoảng 1-3 giây rồi đặt vào máy PCR.

- Chạy máy PCR, khuếch đại DNA đích tạo sản phẩm PCR

+ Vận hành máy PCR.

+ Ly tâm nhanh các tuýp/dây tuýp mẫu khoảng 3-5 giây rồi đặt vào máy PCR, đậy nắp máy.

+ Chạy máy theo chu trình nhiệt bên dưới:

**Bảng 10. Cài đặt chu trình nhiệt cho phản ứng bán lồng RT-PCR**

Bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút:giây)	Số chu kỳ
Hoạt hóa Taq	94	05:00	1
Biến tính	94	0:45	} 25
Gắn mồi	55	01:00	
Kéo dài	72	01:00	
Kéo dài và hoàn chỉnh DNA	72	05:00	1
Giữ	4	∞	

#### 5.5. Phiên giải (diễn giải) kết quả xét nghiệm

##### 5.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

Kết quả điện di sản phẩm PCR được chấp nhận khi:

- Chứng âm phản ứng (NC) và chứng âm tách chiết (Mo): âm tính, không có vạch đặc hiệu.

- Chứng dương: có băng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế như sau:

**Bảng 11. Sản phẩm đặc hiệu cho các phản ứng RT-PCR**

<b>Phản ứng PCR/Bán lồng PCR</b>	<b>Kích thước sản phẩm</b>
Phản ứng PCR phát hiện vi rút Dengue (Môi D1, D2)	511 bp
<b>Phản ứng bán lồng PCR định tít Vi rút Dengue</b>	
D1 (môi D1/TS1)	482 bp
D2 (môi D1/TS2)	119 bp
D3 (môi D1/TS3)	290 bp
D4 (môi D1/TS4)	392 bp

Nếu kết quả của các chứng không đạt yêu cầu thì phải xem xét, tìm hiểu nguyên nhân và xét nghiệm lại.

### **5.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm**

- Mẫu âm tính: khi không có vạch của sản phẩm PCR hoặc xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu ở phản ứng RT-PCR Dengue.

- Mẫu dương tính vi rút dengue (RT-PCR Dengue): khi có vạch sản phẩm PCR đặc hiệu, có kích thước bằng kích thước chứng dương theo đúng yêu cầu xét nghiệm ở phản ứng RT-PCR Dengue.

- Mẫu dương tính trong định tít vi rút dengue (bán lồng PCR Dengue): khi có vạch sản phẩm PCR đặc hiệu với 1 trong 4 tít vi rút dengue; có kích thước bằng kích thước chứng dương theo đúng yêu cầu xét nghiệm.

- Trường hợp sản phẩm bán lồng PCR của mẫu xét nghiệm xuất hiện hai hoặc nhiều vạch tại vị trí đặc hiệu và vị trí không đặc hiệu có thể pha loãng mẫu và làm lại phản ứng bán lồng RT-PCR. Nếu kết quả vẫn không xác định, thì phân lập mẫu và xác định bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang.

### **5.5.3. Ghi chép và báo cáo**

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PNX.

## **6. Phương pháp xét nghiệm đa môi realtime RT-PCR (Multiplex realtime RT-PCR) chẩn đoán và định tít vi rút Dengue**

### **6.1. Phạm vi áp dụng**

Phương pháp xét nghiệm Multiplex realtime RT-PCR định tít vi rút Dengue là phương pháp xét nghiệm ứng dụng kỹ thuật khuếch đại đoạn gen đa môi, trong cùng một hỗn hợp phản ứng có thể thực hiện phiên mã ngược và khuếch đại đoạn gen đích, từ đó phương pháp xét nghiệm này có thể chẩn đoán kết quả theo thời gian thực và các nghiên cứu chuyên sâu về bệnh.

### **6.2. Nguyên lý**

Kỹ thuật realtime RT-PCR (rRT-PCR): Sử dụng một mẫu dò phát huỳnh quang (Probe) có khả năng phát hiện sản phẩm PCR đặc hiệu trong quá trình tổng hợp sản phẩm. Mẫu dò là một đoạn oligonucleotit (ví dụ: Taqman Probe) có đầu 5' được gắn với một chất nhuộm phát tín hiệu huỳnh

quang (R); còn đầu 3' thì được gắn với chất nhuộm hấp phụ huỳnh quang (Q). Khi mẫu dò còn nguyên vẹn, Q có vai trò hấp phụ năng lượng phát ra từ R (hiệu ứng chuyển năng lượng huỳnh quang). Nếu có trình tự đích, mẫu dò và môi sẽ gắn vào khuôn và bắt đầu quá trình tổng hợp. Trong quá trình tổng hợp, Taq DNA polymerase với hoạt tính exonuclease sẽ cắt các nucleotit của mẫu dò từ đầu 5', giải phóng R khỏi Q, làm tăng tín hiệu huỳnh quang của R. Càng nhiều sản phẩm tạo thành thì càng nhiều mẫu dò bị phân cắt và tín hiệu của R phát ra càng nhiều. Đèn đọc tín hiệu huỳnh quang của máy sẽ thu tín hiệu R, xử lý bằng phần mềm và đưa ra kết quả cuối cùng. Quá trình tổng hợp gồm khoảng 45 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm các bước chính: (i) bước biến tính ở nhiệt độ khoảng 95°C; (ii) bước gắn môi, probe và kéo dài ở nhiệt độ khoảng 55-60°C và thu tín hiệu huỳnh quang. Kỹ thuật này cho phép định lượng số bản sao của vật liệu di truyền có trong mẫu thử.

Trong kỹ thuật rRT-PCR mẫu cho vào dung dịch phản ứng là RNA; mẫu RNA này sẽ được tổng hợp thành cADN nhờ các enzyme phiên mã ngược ở nhiệt độ 50°C trong 30 phút trước khi phản ứng PCR xảy ra. Trong kỹ thuật này, cả 2 quá trình tổng hợp cADN và PCR được thực hiện trong cùng 1 tuýp.

### 6.3. An toàn sinh học

Theo Mục 5.3, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh sốt xuất huyết.

### 6.4. Thực hiện xét nghiệm

#### 6.4.1. Mẫu bệnh phẩm

Theo mục 5.4.1 của hướng dẫn này.

#### 6.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao.

##### a) Danh mục sinh phẩm, môi, mẫu dò

- Sinh phẩm, hóa chất sử dụng:
- + QIAamp Viral RNA Mini Kit.
- + SuperScrip™III Platium One-Step.

**Bảng 12. Trình tự môi và mẫu dò trong phản ứng đa môi rRT-PCR**

Môi và mẫu dò		Trình tự (5'-3')	Nồng độ
Dengue 1	D1 F	CAA AAG GAA GTC GTG CAA TA	100µM
	D1C	CTG AGT GAA TTC TCT TCT CTA CTG AAC C	100µM
	Probe Denv1	CAT GTG GTT GGG AGC ACG C	50 µM
Dengue2	D2 F	CAG GTT ATG GCA CTG TCA CGA T	100µM
	D2 C	CCA TCT GCA GCA ACA CCA TCT C	100µM
	Probe Denv2	CTC TCC GAG AAC AGG CCT CGA CTT CAA	50 µM
D3	D3 F	GGA CTG GAC ACA CGC ACT CA	100 µM



Môi và mẫu dò		Trình tự (5'-3')	Nồng độ
	D3 C	CAT GTC TCT ACC TTC TCG ACT TGT CT	100 $\mu$ M
	Probe Denv3	ACC TGG ATG TCG GCT GAA GGA GCT TG	50 $\mu$ M
Dengue 4	D4 F	TTG TCC TAA TGA TGC TGG TCG	100 $\mu$ M
	D4C	TCC ACC TGA GAC TCC TTC CA	100 $\mu$ M
	Probe Denv4	TTC CTA CTC CTA CGC ATC GCA TTC CG	50 $\mu$ M

**Bảng 13. Bộ màu của mẫu dò**

STT	Mẫu dò	Mã báo cáo	Mã thiết kế
1	Probe Denv1	FAM	QSY/TAMRA/NFQ-MGB/BHQ
2	Probe Denv2	VIC/JOE	QSY/TAMRA/NFQ-MGB/BHQ
3	Probe Denv3	TEXAS RED/JBY	QSY/TAMRA/NFQ-MGB/BHQ
4	Probe Denv4	CY5/JUN	QSY/TAMRA/NFQ-MGB/BHQ

**b) Pha sinh phẩm/hóa chất**

Thao tác được thực hiện tại tủ thao tác PCR phòng chuẩn bị dung dịch phản ứng.

- Rửa đông các hóa chất, sinh phẩm cần sử dụng, trộn nhẹ bằng vortex, ly tâm ngắn và xếp các hoá chất, sinh phẩm lên hộp tích lạnh.
- Ghi sơ đồ mẫu ứng với vị trí mẫu trên tấm plate.
- Xác định số lượng phản ứng (N) cần làm:  $N = n + 1$  (với n: là tổng số mẫu xét nghiệm cộng với 4 chứng dương RNA và 1 chứng âm) và tính lượng dung dịch phản ứng theo bảng sau:

**Bảng 14. Sinh phẩm dùng cho phản ứng đa môi rRT-PCR**

Sinh phẩm	Thể tích ( $\mu$ l) cho 1 mẫu	Thể tích ( $\mu$ l) cho $N=(n+1)$ mẫu
Nước tinh sạch	3,7	3,7 x N
2X reagent Mix	12,5	12,5 x N
Môi D1 F (100 $\mu$ M)	0,25	0,25x N
Môi D1 C (100 $\mu$ M)	0,25	0,25x N
Probe Denv-1 (50 $\mu$ M)	0,45	0,45x N
Môi D2 F (100 $\mu$ M)	0,125	0,125x N
Môi D2 C (100 $\mu$ M)	0,125	0,125x N
Probe Denv-2 (50 $\mu$ M)	0,45	0,45x N
Môi D3 F (100 $\mu$ M)	0,25	0,25 x N
Môi D3 C (100 $\mu$ M)	0,25	0,25x N
Probe Denv-3 (50 $\mu$ M)	0,45	0,45x N
Môi D4 F (100 $\mu$ M)	0,125	0,125x N
Môi D4 C (100 $\mu$ M)	0,125	0,125x N

Sinh phẩm	Thể tích ( $\mu$ l) cho 1 mẫu	Thể tích ( $\mu$ l) cho $N=(n+1)$ mẫu
Probe Denv-4 (50 $\mu$ M)	0,45	0,45x N
Superscript III RT/Platium Taq mix	0,5	0,5x N
<b>Tổng</b>	<b>15</b>	
<b>RNA mẫu</b>	<b>5</b>	

- Pha hỗn hợp phản ứng theo bảng đã tính toán trên.
- Trộn nhẹ dung dịch phản ứng bằng vortex, ly tâm nhanh.
- Chia dung dịch phản ứng vào tấm nhựa và phải ghi lại trên sơ đồ mẫu.
- Chuyển tấm nhựa dung dịch phản ứng qua phòng chiết tách để nạp mẫu.

### 6.4.3. Các bước tiến hành thực hiện phản ứng đa môi PCR

#### a) Cho mẫu vào giếng phản ứng

- Cho 5  $\mu$ l mẫu RNA vào giếng mẫu phản ứng theo sơ đồ, trộn đều mẫu với dung dịch phản ứng bằng cách hút trộn 3-4 lần.
- Cho 5  $\mu$ l RNA chứng dương D1, D2, D3, D4 vào các giếng chứng đã theo sơ đồ, trộn đều.

- Cho 5  $\mu$ l nước cất vào giếng chứng âm.

- Dán tấm nhựa bằng miếng dán chuyên dụng hoặc dùng nắp bấm để đậy chặt.

- Ly tâm ngắn tấm nhựa để kéo tất cả các dung dịch bám trên thành giếng xuống.

#### b) Cài đặt và chạy máy (ví dụ: máy 7500 Fast real time PCR system)

- Khởi động máy và cài đặt máy theo hướng dẫn sử dụng máy của nhà sản xuất.

- Đặt tên mẫu và bố trí sơ đồ mẫu.

- Cài đặt 4 môi gồm: Denv-1, Denv-2, Denv-3, Denv-4, chọn (màu Báo cáo (Reporter dye) ứng với màu của mẫu dò, với màu thiết kế (Quencher): chọn NONE.

- Cài chương trình chạy máy:

**Bảng 15. Cài đặt chu trình nhiệt cho phản ứng đa môi RT-PCR**

Bước	Nhiệt độ ( $^{\circ}$ C)	Thời gian (phút:giây)	Số chu kỳ
1	50	30:00	
2	95	2:00	1
3	95	0:10	}45
4	60	0:30	
5	10	$\infty$	

## **6.5. Phiên giải (diễn giải) kết quả xét nghiệm**

### **6.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm**

- Chứng dương Denv-1 có đường khuếch đại ở môi Denv-1 trước và tại chu kỳ 38, và không có đường khuếch đại ở ba môi Denv còn lại.
- Chứng dương Denv-2 có đường khuếch đại ở môi Denv-2 trước và tại chu kỳ 38, và không có đường khuếch đại ở ba môi Denv còn lại.
- Chứng dương Denv-3 có đường khuếch đại ở môi Denv-3 trước và tại chu kỳ 38, và không có đường khuếch đại ở ba môi Denv còn lại.
- Chứng dương Denv-4 có đường khuếch đại ở môi Denv-4 trước và tại chu kỳ 38, và không có đường khuếch đại ở ba môi Denv còn lại.
- Chứng âm không có đường khuếch đại (tín hiệu huỳnh quang) ở tất cả 4 môi hoặc có đường khuếch đại sau chu kỳ 38.

### **6.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm**

- Đọc kết quả của mẫu khi tất cả các chứng dương và chứng âm đều đạt.
- Mẫu âm tính: khi không có đường khuếch đại (không có tín hiệu huỳnh quang) hoặc đường khuếch đại sau chu kỳ 38 ở tất cả 4 môi.
- Mẫu dương tính với DENV týp nào khi có đường khuếch đại ở môi đó (Ct<38).
- Mẫu nghi ngờ khi có đường khuếch đại sau chu kỳ 38.
- Các mẫu nghi ngờ hoặc các mẫu đồng nghiệm cần làm lại để khẳng định kết quả, nếu tiếp tục có đường khuếch đại sau chu kỳ 38 thì kết luận âm tính.

### **6.5.3. Ghi chép và báo cáo**

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

## **IV. Tài liệu tham khảo**

1. Quyết định số 1499/QĐ-BYT ngày 17/05/2011 về việc ban hành Hướng dẫn giám sát và Phòng chống bệnh sốt xuất huyết Dengue.
2. Dengue, Guidelines for Diagnosis, treatment, prevention and control, 2009.
3. Virút Arbo, Nhà xuất bản Y học (2003).
4. Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., (1992), *Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, Journal of Clinical Microbiology, 30, pp. 545-551.
5. Hướng dẫn sử dụng kit Panbio dengue IgM Elisa.
6. Hướng dẫn sử dụng kit Panbio dengue IgG indirect Elisa.
7. Hướng dẫn sử dụng kit Panbio Dengue Duo Cassette
8. Hướng dẫn sử dụng kit Panbio Dengue Early ELISA

9. Hướng dẫn sử dụng kit SD BIOLINE Dengue NS1 Ag
10. Realtime RT-PCR assay for detection and serotype identification of Dengue virus.
11. ISO 15189:2012, Phòng thử nghiệm Y tế - Các yêu cầu cụ thể về năng lực và chất lượng.



## **BỆNH SỞI** **(Measles)**

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

### **I. Mô tả chung**

Sởi là một bệnh truyền nhiễm cấp tính do vi rút sởi gây ra. Biểu hiện của bệnh bao gồm: sốt, phát ban và viêm long đường hô hấp, xuất hiện các hạt nhỏ màu trắng (Koplik) ở niêm mạc miệng. Bệnh sởi có thể gây ra nhiều biến chứng nguy hiểm như viêm tai giữa, viêm phổi, tiêu chảy, khô loét giác mạc mắt, thậm chí có thể viêm não dễ dẫn đến tử vong, bệnh đặc biệt nghiêm trọng ở trẻ nhỏ, trẻ suy dinh dưỡng. Bệnh sởi rất dễ lây lan và thường gây thành dịch. Những năm trước đây tại Việt Nam hầu hết trẻ em đều mắc sởi. Việc triển khai rộng rãi tiêm vắc xin sởi trong nhiều năm đã khống chế thành công bệnh sởi.

Tác nhân gây bệnh là vi rút sởi, thuộc chi *Morbillivirus* của họ *Paramyxoviridae*. Người là ổ chứa duy nhất. Thời kỳ ủ bệnh kéo dài từ 7 – 18 ngày, trung bình 10 ngày. Thời kỳ lây truyền từ 5 ngày trước cho tới 5 ngày sau phát ban. Bệnh chủ yếu lây qua đường hô hấp do hít phải các dịch tiết mũi họng của bệnh nhân bắn ra được khuếch tán trong không khí hoặc tiếp xúc trực tiếp với chất tiết đường mũi họng của bệnh nhân. Bệnh sởi có tốc độ lây nhiễm rất cao, đặc biệt trong điều kiện sống khép kín thì hầu hết những người chưa có miễn dịch đều có thể bị mắc bệnh; miễn dịch có được sau mắc bệnh hoặc sau tiêm vắc xin bền vững; miễn dịch của mẹ truyền cho con có thể bảo vệ trẻ trong vòng 6 đến 9 tháng sau khi ra đời.

### **II. Yêu cầu chung**

#### **1. Nhân sự:**

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

- Tất cả nhân viên kỹ thuật xét nghiệm cần được đào tạo về sử dụng trang thiết bị, đào tạo về thực hành ATSH và thực hành vi sinh chuẩn, đào tạo về đảm bảo chất lượng xét nghiệm.

- Nhân viên phòng xét nghiệm được đào tạo các nội dung sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

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

- Được kiểm tra sức khỏe định kỳ tối thiểu 1 lần hàng năm; được tiêm vắc xin phòng bệnh sởi và kiểm tra kháng thể IgG kháng vi rút sởi hàng năm.

#### **2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị**

##### **2.1. Cơ sở vật chất:**

- Phòng xét nghiệm cần đáp ứng về điều kiện an toàn sinh học, hệ thống quản lý chất lượng phòng xét nghiệm theo quy định hiện hành.

- Các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán bằng ELISA và PCR thì thực hiện tại PXN ATSH cấp II trở lên.

- Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật RT-PCR cần 4 phòng xét nghiệm riêng, bao gồm: phòng pha dung dịch phản ứng (1), phòng tách chiết ARN (2), phòng đặt máy PCR(3) và phòng điện di (4). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) ⇒(2) ⇒ (3) ⇒ (4).

## 2.2. Trang thiết bị.

**Bảng 1: Trang thiết bị**

Tên thiết bị	Thiết bị cần dùng cho XN	
	ELISA	RT-PCR
Dàn máy ELISA (máy ủ, máy rửa, máy đọc)	1 bộ	
Tủ lạnh 2-8°C, tủ âm -20°C, tủ âm – 80°C	1 cái	1 cái
Máy votex	1 cái	1
Máy ly tâm thường	1 cái	1 cái
Micropi pét một kênh (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	1 bộ	1 bộ
Micropi pét đa kênh (8 hoặc 12 kênh) loại 25 µl – 300 µl.	1 bộ	1 bộ
Cốc đong 50 – 1000 ml	1 bộ	1 bộ
Tủ an toàn sinh học	1 cái	1 cái
Máy PCR		1 cái
Máy ly tâm lạnh	1 cái	1 cái
giá tích lạnh	1 cái	1 cái
Lò vi sóng		1 cái
Bộ điện di, máy chụp gel		1 bộ
Cân phân tích		1 cái

## 3. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm

### 3.1. Trước xét nghiệm

#### 3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu đầu vào

- Mẫu máu từ 2 -3 ml trong tuýp không chứa chất chống đông: lấy tốt nhất từ 4 – 28 ngày sau phát ban, ly tâm lấy huyết thanh (không hoặc ít tan máu), bảo quản tại tủ lạnh 2 - 8°C (tối đa 72 giờ) hoặc tủ lạnh - 20°C.

- Dịch ngoáy họng: lấy sớm trong vòng 5 ngày sau phát ban khi có viêm long đường hô hấp, cho tấm bông ngoáy họng trong môi trường (3 ml) bảo quản vi rút. Dịch ngoáy họng phải bảo quản tại tủ lạnh 2 - 8°C (tối đa 72 giờ) hoặc tủ âm sâu (từ -70°C trở xuống).

- Trong quá trình vận chuyển, sử dụng các chất làm lạnh như nước đá, gel lạnh, đá khô để giữ mẫu tại 2°C - 8°C, - 20°C, hoặc -70°C tùy theo nhiệt độ bảo quản tương ứng.

- Kiểm tra chất lượng mẫu: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, chất lượng tốt, đủ thể tích mẫu cho xét nghiệm.

- Kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hay phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.1 của hướng dẫn này.

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

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

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

- Hóa chất sinh phẩm sử dụng trong xét nghiệm phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định của hóa chất/sinh phẩm.

- Hóa chất sinh phẩm khi nhận về phải được kiểm tra, đánh giá chất lượng.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

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

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

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

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

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

## **3.2. Trong xét nghiệm**

### **3.2.1. Nội kiểm**

a. Đối với xét nghiệm ELISA, ngoài các mẫu chứng theo sinh phẩm cần sử dụng mẫu nội kiểm độc lập.

b. Đối với kỹ thuật RT-PCR luôn sử dụng mẫu chứng trong mỗi lần xét nghiệm, trong đó:

- Chứng âm:

+ Chứng âm phản ứng (NTC): phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR hoặc/và realtime RT-PCR

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

- Chứng dương: vi rút Sởi hoặc tương đương.

### **3.2.2. Đánh giá từ bên ngoài**

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



### **3.3. Sau xét nghiệm**

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

- Mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được cất vào hộp và lưu trong tủ lạnh sâu (Mẫu huyết thanh bảo quản  $-20^{\circ}\text{C}$  trở xuống, mẫu dịch ngoáy họng bảo quản  $-70^{\circ}\text{C}$  trở xuống).

- Sau khi cất mẫu vào hộp nhân viên phòng xét nghiệm ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào Sổ lưu giữ mẫu.

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

- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

#### **3.3.2 Tiêu hủy bệnh phẩm**

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:

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

+ Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ

- Hủy mẫu bệnh phẩm theo các bước

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

+ Dán băng dính chỉ thị nhiệt.

+ Hấp ướt tại  $121^{\circ}\text{C}/30$  phút.

+ Sau khi hoàn tất, lấy túi rác thải và kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt.

+ Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.

#### **4. Đọc và đánh giá kết quả:**

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

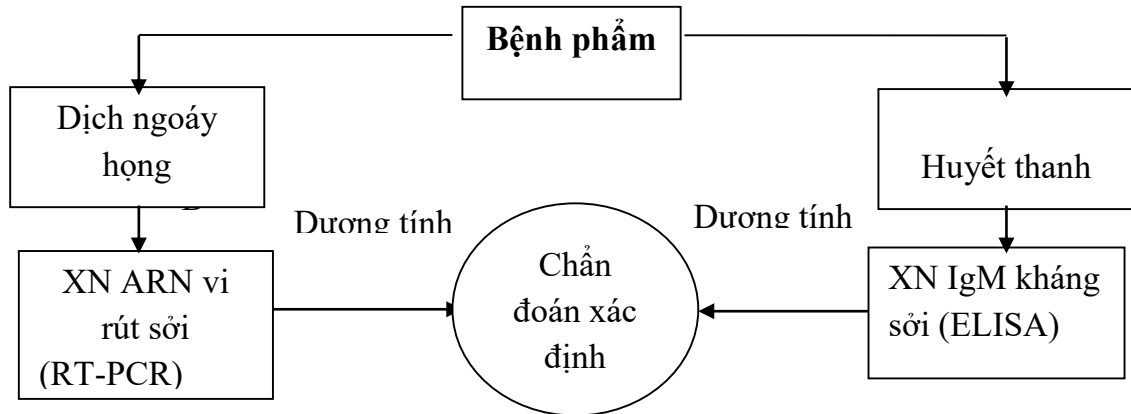
- Phải kiểm tra các kết quả của mẫu chứng, mẫu nội kiểm thỏa mãn điều kiện (tùy theo phương pháp áp dụng) mới tiến hành đánh giá kết quả trên mẫu xét nghiệm.

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

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

Tham khảo mục 5, Phần II, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm.

### III. Phương pháp xét nghiệm



#### Sơ đồ 1: Sơ đồ xét nghiệm

#### 1. Xét nghiệm huyết thanh học phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu vi rút sởi bằng kỹ thuật ELISA.

##### 1.1. Phạm vi áp dụng

Quy trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc chẩn đoán xác định kháng thể IgM kháng vi rút Sởi trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

##### 1.2. Nguyên lý

Giếng ELISA được gắn sẵn kháng nguyên vi rút Sởi. Nếu huyết thanh bệnh nhân có kháng thể IgM kháng vi rút Sởi thì sẽ tạo phức hợp miễn dịch kháng nguyên – kháng thể. Cộng hợp gồm kháng IgM của người gắn enzym peroxidase sẽ kết hợp với kháng thể IgM đặc hiệu. Thành phần enzym trong cộng hợp làm xúc tác cho cơ chất chuyển sang màu xanh. Khi dung dịch dừng phản ứng được thêm vào, phản ứng dừng lại và dung dịch sẽ chuyển sang màu vàng.

##### 1.3. An toàn sinh học

- Thao tác xét nghiệm phải tuân thủ quy định ở mức an toàn sinh học cấp 2.

- Dung dịch dừng phản ứng là chất gây bông nặng, không được cho nước vào dung dịch này

- Không được đổ các hóa chất thừa vào hệ thống nước thải sinh hoạt

- Sử dụng trang phục bảo hộ cá nhân (áo choàng, khẩu trang, kính)

trong suốt quá trình làm xét nghiệm

##### 1.4. Thực hiện xét nghiệm

##### 1.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Loại bệnh phẩm: huyết thanh.

- Thể tích bệnh phẩm dùng trong xét nghiệm: 10-50  $\mu$ l.

- Điều kiện bảo quản: 4°C (không quá 7 ngày), -20°C đến -70°C (trên 7 ngày).

- Huyết thanh lấy ở tủ âm phải để tan băng ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

- Pha loãng mẫu huyết thanh theo tỉ lệ 1 + 20: 10  $\mu$ l mẫu huyết thanh + 200  $\mu$ l dung dịch pha loãng **DILUENT**.

- Thêm 210 µl dung dịch hấp phụ **RF ABSORBENT** vào mẫu huyết thanh đã pha loãng 1+20. Trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút hoặc ở 2-8°C qua đêm.

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

- Sử dụng bộ sinh phẩm Enzygnost®Anti-Measles/Virus IgM của hãng Siemens hoặc tương đương.

- Nước cất 2 lần khử ion (dùng để pha hóa chất và rửa máy rửa): 2 lít.

- Găng tay, khẩu trang.

- Đầu côn có lọc (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl); Đầu côn không lọc (200 µl và 1000 µl).

- Tube nhựa pha loãng mẫu 5 ml có nắp.

##### a. Tiến hành pha sinh phẩm

- Bước 1: Để sinh phẩm ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút trước khi sử dụng.

- Bước 2: Pha loãng cộng hợp CONJUGATE/ANTI M với MICROBIOL/ M theo tỷ lệ 1/50.

- Bước 3: Pha loãng dung dịch rửa WASH/POD với nước cất 2 lần theo tỷ lệ 1/20.

- Bước 4: Pha loãng cơ chất CHROMOGEN/TMB với đệm SUBSTRATE/TMB theo tỷ lệ 1/10.

- Bước 5: Cho 5 ml nước cất vô trùng vào lọ RF ABSORBENT đông khô, lắc cho tan đều.

- Bước 6: Cho dung dịch tạo màu xanh COLOUR/BLUE vào dung dịch pha loãng mẫu DILUENT theo tỷ lệ 1/20.

##### b. Tiến hành chuẩn bị chứng

Pha loãng chứng dương (P/P) và chứng âm (P/N) theo tỉ lệ 1+20: 400 µl dung dịch pha loãng (DILUENT) + 20 µl mẫu chứng.

#### 1.4.3. Các bước tiến hành

- Bước 1: Lấy số giếng cần làm, thiết lập sơ đồ giếng cho chứng âm (P/N), 02 chứng dương (P/P1 và P/P2) và mẫu xét nghiệm trong đó mỗi mẫu xét nghiệm cần tra vào 2 ô trắng song song, theo bảng dưới đây:

**Bảng 2. Sơ đồ tra mẫu**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P/N	P/N										
B	P/P1	P/P1										
C												
D												
E												
F												
G												
H											P/P2	P/P2

\*Ghi chú: Phần ô trống điền thông tin mẫu

- Bước 2: Cho 150  $\mu$ l mẫu chứng âm (P/N), mẫu chứng dương (P/P) và mẫu huyết thanh theo sơ đồ đã chuẩn bị.
- Bước 3: Đậy kín phiến nhựa và ủ ở  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  trong  $60 \pm 2$  phút
- Bước 4: Rửa phiến nhựa 4 lần với dung dịch rửa đã pha loãng.
- Bước 5: Cho cộng hợp 100  $\mu$ l dung dịch cộng hợp đã pha loãng vào mỗi giếng.
- Bước 6: Đậy kín phiến nhựa và ủ ở  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  trong  $60 \pm 2$  phút.
- Bước 7: Rửa phiến nhựa như bước 4.
- Bước 8: Cho 100  $\mu$ l cơ chất đã pha loãng vào mỗi giếng.
- Bước 9: Đậy kín phiến nhựa. Ủ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối/30  $\pm$  2 phút.
- Bước 10: Thêm 100  $\mu$ l/giếng dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng.
- Bước 11: Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA ở bước sóng kép 450/650nm trong vòng 1 giờ.

### 1.5. Phân giải kết quả xét nghiệm

#### 1.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm:

- Giá trị OD của các mẫu chứng cần phải đạt yêu cầu quy định như sau
- Giá trị chứng âm P/N:  $< 0,1$
- Giá trị chứng dương P/P:  $\geq 0,2$
- Nếu kết quả các mẫu chứng không thỏa những điều kiện trên phải làm lại phản ứng.

- Giá trị  $\Delta\text{OD P/N} < 0,1$
- Giá trị của  $\Delta\text{OD P/P1}$ ;  $\Delta\text{OD P/P2} \geq 2$
- Mỗi loạt sinh phẩm đều có 1 giá trị ngưỡng trên và ngưỡng dưới của chứng dương và được ghi rõ trong bảng các thông số kèm theo từng bộ sinh phẩm:

$\text{Ngưỡng dưới} \leq \Delta\text{OD}_{P/P1}$ ;  $\Delta A = \text{OD}_{P/P2} \leq \text{Ngưỡng trên}$   
 (lower margin) (upper margin)  
 $\Delta\text{OD}_{P/P}$  trung bình  $- 20\% \leq \Delta\text{OD}_{P/P1}$ ;  $\Delta\text{OD}_{P/P2} \leq \Delta\text{OD}_{P/P}$  trung bình  $+ 20\%$ .

#### Tính toán kết quả

**Giá trị mẫu :  $\Delta A = \Delta\text{OD}$  X yếu tố hiệu chỉnh**

$\Delta\text{OD} = \text{OD}$  giếng gắn kháng nguyên –  $\text{OD}$  giếng không gắn kháng nguyên.

$$\text{Yếu tố hiệu chỉnh} = \frac{\text{Giá trị danh nghĩa (nominal value)}}{\text{Giá trị } \Delta\text{OD}_{P/P} \text{ trung bình}}$$

Giá trị danh nghĩa: đã cho sẵn trong bảng thông số đi kèm theo mỗi bộ sinh phẩm.

$$\Delta\text{OD}_{P/P} \text{ trung bình} = (\Delta\text{OD}_{P/P1} + \Delta\text{OD}_{P/P2}) / 2$$

#### 1.5.2. Nhận định kết quả

- Mẫu âm tính khi  $\Delta A < 0,1$
- Mẫu dương tính khi  $\Delta A > 0,2$

- Mẫu nghi ngờ khi  $0,1 \leq \Delta A \leq 0,2$

### **1.5.3. Ghi chép và báo cáo**

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

## **2. Phương pháp xét nghiệm RT-PCR phát hiện ARN của vi rút Sởi**

### **2.1. Phạm vi áp dụng**

Quy trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc xác định ARN của vi rút Rubella trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

### **2.2. Nguyên lý**

- ARN tổng số được tách từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi nhiễm vi rút sởi. Sau đó, ARN được cho vào hỗn hợp RT-PCR với mỗi đặc hiệu với vi rút sởi. Nhờ vào chu trình nhiệt và cặp mỗi đặc hiệu, phản ứng RT - PCR sẽ phiên mã ngược ARN thành cADN và sau đó khuếch đại số lượng cADN (ADN bổ sung) của vi rút sởi thành hàng triệu bản sao. Các bản sao sẽ được phát hiện bằng kỹ thuật điện di.

- Nguyên tắc của phương pháp điện di dựa vào đặc tính cấu trúc của các nucleic acid. Đó là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác động của điện trường, chúng sẽ di chuyển về cực dương của điện trường. Các axit nucleic trong gel Agarose sẽ quan sát được dưới tia tử ngoại (UV) nhờ một hóa chất có tên là Ethidium bromide. Chất này có khả năng gắn xen vào giữa các base của các nucleic acid và dưới tác dụng của tia tử ngoại sẽ phát huỳnh quang.

- Sử dụng thang ADN chuẩn (DNA ladder) với kích thước đã biết trước để so sánh với mẫu chứng dương và mẫu cần phân tích. Kích thước sản phẩm của virus sởi là 600 bp.

### **2.3. An toàn sinh học**

- Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về an toàn sinh học theo quy định hiện hành đối với Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp II.

- Thuốc nhuộm ethidium bromide là một chất độc có thể gây ung thư cho người và động vật. Do đó, khi sử dụng hóa chất này phải mang găng tay và kính bảo hộ. Dung dịch sau khi sử dụng phải cho chảy qua than hoạt tính trước khi đổ bỏ hoặc có biện pháp xử lý chuyên biệt khác.

- Tham khảo các thuốc nhuộm khác an toàn như Sybr Green, GelRed, v.v.

### **2.4. Thực hiện xét nghiệm**

#### **2.4.1. Mẫu bệnh phẩm**

- Mẫu bệnh phẩm để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút để tan băng (nếu để ở  $-80^{\circ}\text{C}$ ), trộn kỹ bằng máy vortex

- Tách chiết ARN tổng số theo hướng dẫn của bộ **QIAamp Viral RNA mini Kits** (tham khảo Mục 4.1.3, Phần III, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm).

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

- QIAGEN One step RT-PCR Kits, 100 phản ứng
- Găng tay không bột
- Đầu tip có lọc 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l
- Tube nhựa vô trùng 0,2 ml, 1,5 ml

##### a. Tiến hành pha sinh phẩm

- Sử dụng tuýp PCR 0,2 ml
- Pha hỗn hợp master mix bao gồm: N = tổng số mẫu xét nghiệm + 1 mẫu chứng dương + 02 mẫu chứng âm + n (=1 nếu số mẫu XN <10; =2 nếu mẫu >10)

**Bảng 3. Sinh phẩm dùng cho phản ứng RT-PCR**

Sinh phẩm	Thể tích ( $\mu$ l)	Thể tích cho N phản ứng ( $\mu$ l)
QIAGEN 5X PCR Buffer	4,0	4,0 x N
dNTPs (kit)	0,8	0,8 x N
MV 60 (20 $\mu$ M)	0,6	0,6 x N
MV 63-3(20 $\mu$ M)	0,6	0,6 x N
Enzyme mix (kit)	0,8	0,8 x N
Rnase Inhibitor	0,2	0,2 x N
Nước cất tinh sạch (kit)	11,0	11,0 x N
ARN mẫu	2,0	
Tổng số	<b>20</b>	

##### b. Tiến hành pha cặp mồi

**Bảng 4. Trình tự mồi**

Tên mồi	Trình tự nucleotid (5' – 3')
MeV216 (mồi xuôi)	TGG AGC TAT GCC ATG GGA GT
MeV214 (mồi ngược)	TAA CAA TGA TGG AGG GTA GG

- Trả lại nước khử ion theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đạt nồng độ gốc.

- Nồng độ mồi sau đó được pha từ nồng độ gốc và tính theo đơn vị nmol (ghi trên tuýp mồi đông khô).

- Cách hoàn nguyên mồi:

$C_M = n/V$  Trong đó: V – thể tích nước cần hoàn nguyên

n – nồng độ gốc

$C_M$  – nồng độ cần hoàn nguyên

- Chia ra các tuýp có thể tích 300 $\mu$ l / 1 loại mồi và bảo quản tại nhiệt độ -20°C.

### 2.4.3. Các bước tiến hành thực hiện phản ứng RT-PCR

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

- Cho 3  $\mu$ l mẫu ARN bệnh phẩm vào hỗn hợp sinh phẩm đã chuẩn bị cho phản ứng RT-PCR.

- Cho các mẫu chứng vào tuýp tương ứng. Mẫu chứng dương: được thực hiện tại tủ An toàn sinh học cấp II.

- Khởi động và kiểm tra chương trình trước khi chạy máy luân nhiệt cổ điển theo yêu cầu xét nghiệm.

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

**Bảng 5. Chương cài đặt chu trình nhiệt cho phản ứng PCR**

Bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút:giây)	Số chu kỳ
1	50	30:00	1
2	95	15:45	}40
3	94	0:30	
4	55	0:30	
5	72	01:00	
6	72	10:00	1
7	4	$\infty$	

Sau khi kết thúc quá trình luân nhiệt, tiến hành điện di sản phẩm và phân tích kết quả trên bản gel agarose và đọc trên máy chụp UV

### 2.4.4. Điện di sản phẩm RT-PCR

#### a. Sinh phẩm, hóa chất chạy điện di:

**Bảng 6. Các sinh phẩm/hóa chất để điện di sản phẩm sau RT-PCR**

Tên hóa chất	Nồng độ	Bảo quản
Agarose	1,5%.	Nhiệt độ phòng 15 - 25°C
TAE 1X		Nhiệt độ phòng 15 - 25°C
Ethidium Bromide 10mg/ml	5 – 10 $\mu$ l/100 ml TAE 1X	Tủ lạnh 2 - 8°C
Loading dye	2 -3 $\mu$ l	Tủ lạnh 2 - 8°C
Thang ADN chuẩn	5- 8 $\mu$ l	Tủ lạnh 2 – 8°C

#### b. Chạy điện di

- Chuyển sản phẩm PCR vào thạch.

- Đặt thạch vào bể điện di theo đúng chiều dòng điện từ âm sang dương rồi cho TBE 1X ngập bản thạch sao cho dung dịch đậm cách mặt thạch từ 1 - 2 mm.

- Cho 2  $\mu$ l đậm đặt mẫu (Loading Dye) vào từng giếng của đĩa microtitre hoặc trên giấy parafilm với số lượng tương ứng với số mẫu cần phân tích. Đem Loading chứa 50% Glycerol vì vậy có tác dụng kéo ADN

xuống dưới đáy của giếng điện di và còn chứa Bromophenol Blue có tác dụng đánh dấu ADN trong quá trình chạy.

- Trộn 8-10  $\mu$ l mỗi sản phẩm PCR với 2  $\mu$ l đệm đặt mẫu.
- Trộn 5 - 8  $\mu$ l thang chuẩn ADN 100 bp hoặc 1.000 bp với 2  $\mu$ l đệm đặt mẫu (nếu thang chuẩn AND chưa có sẵn đệm đặt mẫu).
- Chuyển dung dịch đã được trộn với nhau vào trong các giếng của bản thạch.
- Đóng nắp của bể điện di, chọn dòng điện 110V và thời gian 30 phút.
- Tắt máy điện di, chuyển thạch sang máy đọc.
- Soi và chụp ảnh.
- Đặt bản thạch ngay ngắn trên máy đọc gel, bật đèn tím để đọc gel và chụp ảnh.

**Chú ý:** Do sản phẩm PCR nhạy với đèn tím nên hạn chế để bản thạch tiếp xúc với đèn tím. Ngay sau khi căn chỉnh và chụp được kết quả đẹp cần tắt ngay đèn tím.

## **2.5. Phân giải kết quả xét nghiệm**

### **2.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm**

- Chứng âm phản ứng: (NTC) nước cất không chứa nuclease (trong bộ sinh phẩm QIAGEN One step RT-PCR Kits) để kiểm tra ngoại nhiễm trong quá trình pha master mix, phải cho kết quả âm tính.
- Chứng âm tách chiết (NEC): mẫu tách chiết là môi trường vận chuyển và được tách chiết cùng mẫu bệnh phẩm: phải cho kết quả âm tính.
- Chứng dương virus sợi: giá trị so sánh với thang DNA chuẩn: 600bp.
- Nếu kết quả các mẫu chứng không thỏa những điều kiện trên phải làm lại phản ứng.

### **2.5.2. Nhận định KQ**

#### **a) Kết quả được chấp nhận khi:**

- Chứng dương: có băng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế (600 bp)
- Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): âm tính.
- Mẫu âm tính: sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.
- Dương tính: sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước bằng kích thước chứng dương.

#### **b) Làm lại xét nghiệm khi có các trường hợp sau xảy ra**

- Chứng dương không có vạch đặc hiệu ở vị trí 600 bp: kiểm tra lại chứng dương và thực hiện lại phản ứng PCR ở bước pha hỗn hợp master mix.
- Chứng âm master mix có vạch ở vị trí 600 bp: thực hiện lại phản ứng PCR ở bước pha hỗn hợp master mix.

### **2.5.3. Ghi chép và báo cáo**

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán Rubella.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.



- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

#### **IV. Tài liệu tham khảo**

1. Quyết định số 4845/QĐ-BYT, *Hướng dẫn giám sát và phòng chống bệnh sởi, Rubella*, ngày 5 tháng 12 năm 2012.

2. Hướng dẫn sử dụng bộ sinh phẩm Enzygnost®Anti-Measles virus/IgM của hãng Siemens.

3. Hướng dẫn sử dụng kit tách chiết “QIAamp® Viral RNA mini Kits” của hãng QIAGEN.

4. WHO, UNICEF và CDC, *Global measles and Rubella strategic plan 2012*, World Health Organization, United Nations Children's Fund, Switzerland, 43.

5. David L. Heymann, *Control of communicable diseases manual*, 20th edition, p. 390, 2015.

## **BỆNH TAY CHÂN MIỆNG** **(Hand-foot-mouth disease - HFMD)**

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

### **I. Mô tả chung**

Bệnh tay-chân-miệng là một bệnh dễ lây lan với đường lây truyền thường từ người sang người do tiếp xúc với các dịch tiết mũi họng, nước bọt, chất dịch từ các bọt nước hoặc phân của người bệnh. Giai đoạn lây lan mạnh nhất là tuần đầu tiên bị bệnh. Bệnh tay – chân - miệng không phải là bệnh lây từ động vật sang người.

Thời kỳ ủ bệnh thường từ 3 đến 7 ngày. Sốt thường là triệu chứng đầu tiên của bệnh. Đầu tiên virus thường cư trú ở niêm mạc má hay niêm mạc hồi tràng và sau 24 giờ, virus lan đến các hạch bạch huyết vùng. Nhiễm virus huyết thường xảy ra nhanh chóng, sau đó virus di chuyển đến niêm mạc miệng và da. Vào ngày thứ 7 sau khi nhiễm bệnh, kháng thể trung hòa tăng cao và virus bị thải loại.

Bệnh tay – chân - miệng xảy ra chủ yếu ở trẻ em dưới 10 tuổi tuy nhiên cũng có thể gặp ở cả người trưởng thành.

Bệnh tay-chân-miệng xuất hiện khắp nơi trên thế giới. Trong thời gian gần đây, dịch tay-chân-miệng chủ yếu do *Enterovirus 71* gây ra ở các nước Đông Nam Á. Vụ dịch tại Đài Loan năm 1998 được coi là vụ dịch lớn với hơn 100.000 người mắc, hơn 400 trẻ phải nhập viện với các biến chứng ở hệ thần kinh trung ương, 78 trẻ tử vong.

Tại Việt Nam, bệnh tay-chân-miệng gặp rải rác quanh năm ở hầu hết các địa phương trong cả nước; tại các tỉnh phía Nam, số mắc tập trung từ tháng 3 đến tháng 5 và từ tháng 9 đến tháng 12.

### **II. Yêu cầu chung**

#### **1. Nhân sự**

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

- Tất cả nhân viên kỹ thuật xét nghiệm cần được đào tạo về sử dụng trang thiết bị, đào tạo về thực hành ATSH và thực hành vi sinh chuẩn, đào tạo về đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Nhân viên phòng xét nghiệm được đào tạo các nội dung sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

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

#### **2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị**

##### **2.1. Cơ sở vật chất:**

- Phòng xét nghiệm cần đáp ứng về điều kiện an toàn sinh học, hệ thống quản lý chất lượng phòng xét nghiệm theo quy định hiện hành.

- Các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán các *Enterovirus* được áp dụng cho phòng xét nghiệm ATSH II.

- Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật RT-PCR cần 4 phòng xét nghiệm riêng, bao gồm: phòng pha dung dịch phản ứng (1), phòng tách chiết ARN (2), phòng đặt máy PCR(3) và phòng điện di (4). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) ⇒(2) ⇒ (3) ⇒ (4).

## 2.2. Trang thiết bị

**Bảng 1: Trang thiết bị**

Tên thiết bị	RT-PCR
Micropipette	03 bộ
Tủ lạnh bảo quản mẫu	01 cái
Tủ ATSH cấp 2	01 cái
Nồi hấp ướ	01 cái
Máy ly tâm lạnh tốc độ 14.000 vòng/phút	01 cái
Máy vortex	02 cái
Giá tích lạnh	02 cái
Tủ thao tác PCR	01 cái
Máy luân nhiệt PCR	01 cái
Máy realtime PCR	
Máy làm đá vảy	01 cái
Hệ thống máy điện di	01 bộ
Lò vi sóng	01 cái
Tủ lạnh âm sâu bảo quản mẫu	01 cái
Tủ lạnh âm sâu bảo quản mẫu ARN	01 cái
Tủ lạnh -20°C bảo quản sinh phẩm	01 cái
Cân	01 cái

- Hồ sơ thiết bị gồm: hồ sơ xác nhận ban đầu của thiết bị, lý lịch thiết bị, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Có danh sách thiết bị, hướng dẫn sử dụng thiết bị.

- Đào tạo cho các nhân viên vận hành thiết bị theo đúng hướng dẫn.

## 3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm

### 3.1. Trước xét nghiệm

#### 3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu đầu vào

- Loại mẫu: phân, dịch ngoáy họng, dịch ngoáy trực tràng, thể tích: 200 - 500 $\mu$ l.

- Điều kiện bảo quản: môi trường vận chuyển vi rút.

- Bảo quản tại nơi lấy mẫu: bảo quản bệnh phẩm tại nơi lấy mẫu ở 2°C - 8°C, trong vòng 3 ngày mẫu sẽ được chuyển tới phòng xét nghiệm, trong trường hợp bảo quản trên 3 ngày cần bảo quản tại nhiệt độ -70°C. Trong quá trình vận chuyển giữ tại 2°C - 8°C hoặc -70°C trong trường hợp đã bảo quản mẫu tại nhiệt độ -70°C.

- Kiểm tra chất lượng mẫu: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, chất lượng tốt, đủ thể tích mẫu cho xét nghiệm.

- Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.1 của hướng dẫn này.

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

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

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

- Hóa chất sinh phẩm sử dụng trong phản ứng sinh học phân tử phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định của hóa chất/sinh phẩm.

- Hóa chất sinh phẩm khi nhận về phải được kiểm tra, đánh giá chất lượng.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

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

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

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

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

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

## **3.2. Trong xét nghiệm**

### **3.2.1. Nội kiểm**

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

- Chứng âm:

+ Chứng âm phản ứng (NTC): phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR hoặc/và realtime RT-PCR

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

- Chứng dương: gồm *Enterovirus (Enterovirus 71, Coxsackievirus A16...)*.

### **3.2.2. Đánh giá từ bên ngoài**

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

### **3.3. Sau xét nghiệm**

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

- Mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được cất vào hộp và lưu trong tủ lạnh sâu (từ -70°C trở xuống).

- Sau khi cất mẫu vào hộp nhân viên phòng xét nghiệm ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào Sổ lưu giữ mẫu.

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

- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

#### **3.3.2. Tiêu hủy bệnh phẩm**

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:

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

+ Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ.

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

- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.

- Hấp ướt tại 121°C/30 phút.

- Sau khi hoàn tất, kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt, các thông số trên máy đạt và lấy túi rác thải.

- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.

### **4. Đọc và đánh giá kết quả**

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

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

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

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

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

Tham khảo mục 5, Phần II, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm.

### **III. Phương pháp xét nghiệm tay-chân-miệng bằng phương pháp chẩn đoán RT-PCR**

Xét nghiệm chẩn đoán sinh học phân tử vi rút Tay Chân Miệng dựa trên phát hiện vật liệu di truyền của vi rút *Enterovirus* bằng phương pháp chẩn đoán RT-PCR. Qui trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc xác định *Enterovirus*, *Enterovirus 71*, *Coxsackievirus A16* trong mẫu bệnh phẩm hoặc dịch nuôi cấy.

## **1. Phạm vi áp dụng**

Qui trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc xác định *Enterovirus* và các phân nhóm của *Enterovirus* trong mẫu bệnh phẩm hoặc dịch nuôi cấy.

## **2. Nguyên lý**

ARN của vi rút cúm được phiên mã ngược thành cADN. Sau đó cADN được cho vào tuýp chứa dung dịch (dd) phản ứng PCR bao gồm cặp mồi đặc hiệu cho vi rút cúm, enzyme Taq ADN polymerase, dNTPs... Tuýp phản ứng được đặt vào máy luân nhiệt PCR để khuếch đại đoạn trình tự đích theo chương trình nhiệt được cài đặt sẵn. Quá trình tổng hợp gồm khoảng 30-35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước chính: (i) bước biến tính ở nhiệt độ khoảng 94°C - 95°C; (ii) bước gắn mồi ở nhiệt độ khoảng 50°C - 55°C; và (iii) bước kéo dài ở nhiệt độ 72°C. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose để phát hiện sự có mặt hay không của đoạn gen đích đã được khuếch đại.

## **3. An toàn sinh học**

- Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về an toàn sinh học theo quy định hiện hành đối với Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp II.

- Thuốc nhuộm Ethidium bromide là một chất độc có thể gây ung thư cho người và động vật. Do đó, khi sử dụng hóa chất này phải mang găng tay và kính bảo hộ. Dung dịch sau khi sử dụng phải cho chảy qua than hoạt tính trước khi đổ bỏ hoặc có biện pháp xử lý chuyên biệt khác.

- Tham khảo các thuốc nhuộm khác an toàn như Sybr Green, GelRed...

## **4. Thực hiện xét nghiệm**

### **4.1. Mẫu bệnh phẩm**

#### **a. Bệnh phẩm:**

- Mẫu bệnh phẩm từ phân, dịch ngoáy họng, dịch ngoáy trực tràng.

- Thể tích: 200 - 500µl.

#### **b. Yêu cầu:**

Bệnh phẩm bảo đảm chất lượng đầu vào theo mục 3.1.1 hướng dẫn này.

#### **c. Tách chiết mẫu:**

Tách chiết ARN tổng số theo hướng dẫn của bộ QIAamp Viral RNA mini Kits (tham khảo Mục 4.1.3, Phần III, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm). Thao tác được thực hiện trong tủ an toàn sinh học cấp 2 tại phòng tách chiết.

### **4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao**

#### **4.2.1. Pha dung dịch phản ứng cho RT-PCR**

- Thao tác được thực hiện tại tủ thao tác PCR phòng chuẩn bị dung dịch phản ứng. Sinh phẩm dùng trong phản ứng RT-PCR: Access RT – PCR System Kit hoặc tương đương.

- Xếp các hoá chất, sinh phẩm cần sử dụng lên hộp tích lạnh theo thứ tự trong bảng pha dung dịch phản ứng

- Đánh dấu tuýp 1.5 ml hoặc tuýp 0.5 ml dùng để trộn sinh phẩm và đặt lên hộp tích lạnh.

- Xác định số lượng phản ứng (N) cần làm:  $N = n + 1$  (với n: là tổng số mẫu xét nghiệm cộng với 1 chứng dương ARN).

**Bảng 2: Thành phần pha sinh phẩm\***

Sinh phẩm	Thể tích (µl)	Thể tích cho N phản ứng (µl)
5X AMV Buffer	5	5 x N
25mM MgSO <sub>4</sub>	1	1 x N
10mM dNTPs	0,5	0,5 x N
MD90 (20pmol)	1,5	1,5 x N
MD91 (20pmol)	1,5	1,5 x N
AMV RT (5u/µl)	0,5	0,5 x N
Tfl Taq DNA Polymerase	0,5	0,5 x N
Rnasine (40u/µl)	0,12	0,12 x N
Nuclease Free Water	9,38	9,38 x N

\* Ghi chú: cho Enterovirus và phân týp Enterovirus 71, Coxsackievirus A16

#### 4.2.2. Pha cặp môi cho phương pháp RT-PCR

**Bảng 3: Bộ môi cho phản ứng RT-PCR**

Môi	Tên môi	Trình tự (5'-3')
<i>Enterovirus</i>	<b>MD90</b>	5'- ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3'
	<b>MD91</b>	5'- CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAAT -3'
<i>Enterovirus 71</i>	<b>MAS01S</b>	5'-ATA ATA GCA(C/T)T(a/G)GC GGC AGC CCA-3'
	<b>MAS02A</b>	5'- AGA GGG AG(A/G) TCT ATC TC(C/T) CC -3'
<i>Coxsackievirus A16</i>	<b>CA16-VP1F</b>	5'-AGG GTA ATG GAR TGT GGT GAY T 3'
	<b>CA16-VP1R</b>	5'-TGT GTG TTG AAC CAT CAC TC-3'

- Trả lại nước khử ion theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đạt nồng độ gốc.

- Nồng độ môi sau đó được pha từ nồng độ gốc và tính theo đơn vị nmole (ghi trên tuýp môi đông khô).

- Chia ra các tuýp có thể tích 300 µl / 1 loại môi và bảo quản tại -20°C.

#### 4.2.3. Pha thạch điện di

- Pha dung dịch đệm TBE 10X

- + Tris Base 108g
- + Axít Boric 55 g
- + Nước cất 600 ml
- + Hòa tan Tris Base và Boric acid trong nước
- + Thêm EDTA 0.5M, pH8 20 ml
- + Thêm nước cất cho đủ 1.000 ml

+ Kiểm tra pH trong khoảng 8 – 8.3; nếu pH ngoài khoảng này thì phải pha lại, không chỉnh pH bằng hóa chất vì sự thay đổi nồng độ ion sẽ ảnh hưởng đến sự di chuyển của DNA trong bản thạch khi điện di.

+ Hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C/20 phút.

+ Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- Pha dung dịch đậm TBE 1X:

Khi sử dụng lấy 100ml TBE 10X pha vào 900ml nước cất thành dung dịch TBE 1X, bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- Nồng độ hóa chất được pha theo hướng dẫn tại Bảng 5.

**Bảng 4: Số lượng thành phần Agarose được chuẩn bị**

<b>Thạch Agarose</b>	<b>Nồng độ 2,5%</b>
TBE 1x (ml)	100
Agarose (g)	2,5
Ethidium bromide 10mg/ml	10

- Cách đổ thạch:

+ Đổ thạch bằng khay điện di có cài sẵn rãnh lược.

+ Đo lượng Agarose và TBE phụ thuộc vào nồng độ thạch và số lượng khuôn thạch cần chuẩn bị được tính theo bảng trên. Ví dụ: Chuẩn bị 100 ml thạch 2,5%: cần 2,5 g Agarose bột và 100ml TBE. Sau đó cho Agarose bột và dung dịch TBE vào cốc thủy tinh. Làm tan Agarose bằng lò vi sóng trong khoảng 3 - 4 phút, đảm bảo Agarose tan hoàn toàn.

+ Để nguội khoảng 50 – 60°C rồi cho 10 µl Ethidium bromide lắc đều, đổ dung dịch Agarose này vào khuôn điện di có cài sẵn rãnh lược. Sau khoảng 60 phút ở nhiệt độ phòng, khi bản thạch đã đông, gỡ nhẹ nhàng rãnh lược ra. Bảo quản thạch ở 4°C.

### **4.3. Các bước tiến hành thực hiện phản ứng RT-PCR**

- Ghi mã số mẫu vào biểu mẫu kết quả xét nghiệm RT-PCR;

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

- Cho các mẫu chứng vào tuýp tương ứng. Mẫu chứng dương: được thực hiện tại tủ An toàn sinh học cấp II;

- Khởi động và kiểm tra chương trình trước khi chạy máy luân nhiệt cổ điển theo yêu cầu xét nghiệm;

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

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

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



**Bảng 5: Thông số chu trình nhiệt RT-PCR Tay Chân Miệng**

	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp
<i>Enterovirus</i>	48	45:00	1
	94	02:00	1
	<b>94</b>	<b>0:10</b>	} x 35
	<b>60</b>	<b>0:10</b>	
	<b>65</b>	<b>01:00</b>	
	65	5:00	1
	4	∞	
<i>Eterovirus 71</i>	51	30:00	1
	<b>92</b>	<b>0:30</b>	} x 40
	<b>51</b>	<b>0:45</b>	
	72	01:00	1
	72	05:00	
	4	∞	
<i>Coxsackievirus A16</i>	48	45:00	1
	95	05:00	1
	<b>94</b>	<b>0:45</b>	} x 50
	<b>45</b>	<b>0:45</b>	
	<b>72</b>	<b>1:30</b>	
	72	8:00	1
	4	∞	

**4.4. Điện di sản phẩm RT-PCR**

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

## 5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

### 5.1. Đọc kết quả xét nghiệm:

- Chứng dương: có băng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế.

- Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): không có băng đặc hiệu.

- Mẫu dương tính: sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước bằng kích thước chứng dương.

- Mẫu âm tính: là sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.

**Bảng 6. Kích thước sản phẩm PCR đặc hiệu**

Vi rút Tay Chân Miệng và phân tuýp	Độ dài sản phẩm khuếch đại
<i>Enterovirus</i>	154 bp
<i>Enterovirus 71</i>	376 bp
<i>Coxsackievirus A16</i>	550 bp

### 5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Trong trường hợp chứng âm phản ứng dương tính mà chứng âm tách chiết âm tính thì làm lại từ khâu pha mix, trong trường hợp chứng âm phản ứng âm tính mà chứng âm tách chiết dương tính thì làm lại từ khâu tách chiết. Kết quả của phương pháp RT-PCR không cho kết quả rõ ràng hoặc trong trường hợp cần khẳng định chính xác kết quả, phòng xét nghiệm có thể yêu cầu lấy lại bệnh phẩm và xét nghiệm theo thường quy của phòng từ bước nhận bệnh phẩm hoặc phòng xét nghiệm một lần nữa.

- PCR được kết luận là dương tính nếu:

- + Mẫu chứng âm có kết quả âm tính
- + Mẫu chứng dương có kết quả dương tính
- + Mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính

- PCR được kết luận là âm tính nếu:

- + Mẫu chứng âm có kết quả âm tính
- + Mẫu chứng dương có kết quả dương tính
- + Mẫu bệnh phẩm có kết quả âm tính

- PCR không được phép kết luận nếu:

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

### 5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán Tay Chân Miệng

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

#### **IV. Tài liệu tham khảo**

1. Viện VSDT Trung Ương, Viện Pasteur Hồ Chí Minh, Viện VSDT Tây Nguyên và Viện Pasteur Nha Trang (2015), *Hội thảo thống nhất quy trình xét nghiệm Enterovirus*, TP. Hồ Chí Minh, 2015.

2. Thao NT, Ngoc NT, Tú PV, Thúy TT, Cardoso MJ, McMinn PC, Phuektes P. (2010), *Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous identification of human enterovirus 71 and coxsackievirus, A16*. Journal Virology Methods;170(1-2):134-9.

## **BỆNH DO VI RÚT ZIKA**

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

### **I. Mô tả chung**

Vi rút Zika thuộc họ *Flaviviridae*, thuộc chi *Flavivirus*. Vật liệu di truyền của vi rút là ARN sợi đơn dương có kích thước khoảng 11 kilo base. Vi rút Zika gây bệnh qua vec tơ truyền bệnh là muỗi.

Bệnh do vi rút Zika có thời gian ủ bệnh từ 3-12 ngày. Bệnh có biểu hiện sốt, phát ban, viêm kết mạc mắt, đau cơ khớp, mệt mỏi, đau đầu. Bệnh thường kéo dài từ 2-7 ngày, đa số là các trường hợp có biểu hiện nhẹ, khoảng 60-80% không có biểu hiện lâm sàng.

Năm 1947, vi rút Zika lần đầu được phát hiện ở khỉ tại rừng Zika thuộc Uganda. Năm 1948, vi rút Zika được phân lập từ muỗi. Năm 1952, vi rút Zika được phân lập từ người tại Uganda và Tanzania. Dịch Zika đã có báo cáo tại Châu Phi, Châu Mỹ, Châu Á và khu vực Thái Bình Dương. Giai đoạn từ 1960-1980, sự nhiễm bệnh ở người đã thấy ở Châu Phi và Châu Á với các triệu chứng nhẹ. Tháng 7 năm 2015 Brazil phát hiện có sự liên quan giữa nhiễm vi rút Zika và hội chứng Guillain – Barre. Tháng 10 năm 2015 Brazil phát hiện sự liên quan giữa nhiễm vi rút Zika và hội chứng trẻ đầu nhỏ.

Hiện nay, phương pháp xét nghiệm chủ yếu phát hiện vi rút Zika ở Việt Nam là sử dụng phương pháp sinh học phân tử xác định vật liệu di truyền của vi rút trong bệnh phẩm bao gồm RT- PCR và realtime RT- PCR.

### **II. Yêu cầu chung**

#### **1. Nhân sự**

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

- Tất cả nhân viên kỹ thuật xét nghiệm cần được đào tạo về sử dụng trang thiết bị, đào tạo về thực hành ATSH và thực hành vi sinh chuẩn, đào tạo về đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Nhân viên phòng xét nghiệm được đào tạo các nội dung sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

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

#### **2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị**

##### **2.1. Cơ sở vật chất:**

- Phòng xét nghiệm cần đáp ứng điều kiện an toàn sinh học cấp II, hệ thống quản lý chất lượng phòng xét nghiệm theo quy định hiện hành.

- Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật RT-PCR cần 4 phòng xét nghiệm riêng, bao gồm: phòng pha dung dịch phản ứng (1), phòng tách chiết ARN (2), phòng đặt máy PCR(3) và phòng điện di (4). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) ⇒ (2) ⇒ (3) ⇒ (4).

- Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật realtime RT-PCR cũng tương tự như RT-PCR, tuy nhiên không có phòng điện di.

## 2.2. Trang thiết bị

**Bảng 1: Trang thiết bị**

Tên thiết bị	RT-PCR	realtime RT-PCR
Micropipette	03 bộ	03 bộ
Tủ lạnh bảo quản mẫu	01 cái	01 cái
Tủ ATSH cấp 2	01 cái	01 cái
Nồi hấp ướ	01 cái	01 cái
Máy ly tâm lạnh tốc độ tối đa 14000 vòng/phút	01 cái	01 cái
Máy vortex	02 cái	02 cái
Giá tích lạnh	02 cái	02 cái
Tủ thao tác PCR	01 cái	01 cái
Máy luân nhiệt PCR	01 cái	
Máy realtime PCR		01 cái
Máy làm đá vảy	01 cái	01 cái
Hệ thống máy điện di	01 bộ	
Lò vi sóng	01 cái	
Tủ lạnh âm sâu bảo quản mẫu	01 cái	01 cái
Tủ lạnh âm sâu bảo quản mẫu ARN	01 cái	01 cái
Tủ lạnh -20°C bảo quản sinh phẩm	01 cái	01 cái
Cân	01 cái	

- Hồ sơ thiết bị gồm: hồ sơ xác nhận ban đầu của thiết bị, lý lịch thiết bị, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Cần có danh sách thiết bị, hướng dẫn sử dụng thiết bị.

- Đào tạo cho các nhân viên vận hành thiết bị theo đúng hướng dẫn.

### 3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm

#### 3.1. Trước xét nghiệm

##### 3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu đầu vào

- Mẫu máu thu thập trong vòng 5 ngày kể từ ngày khởi phát, không có chất chống đông, (tách huyết thanh) cần thể tích tối thiểu 3-5 ml máu tĩnh mạch.

- Mẫu nước tiểu thu thập trong vòng 20 ngày kể từ ngày khởi phát cần thể tích tối thiểu 5 - 10 ml.

- Mẫu tinh dịch thu thập trong trường hợp có chỉ định cần thể tích tối thiểu 500 $\mu$ l.

*Chú ý:* Mẫu huyết thanh rất có giá trị chẩn đoán Zika, nếu xét nghiệm các loại mẫu khác thì phải tiến hành xét nghiệm song song với mẫu huyết thanh.

- Bảo quản tại nơi lấy mẫu: mẫu bệnh phẩm bảo quản ở 2°C - 8°C và được chuyển tới phòng xét nghiệm trong vòng 3 ngày. Trong trường hợp bảo quản trên 3 ngày cần bảo quản tại nhiệt độ -70°C. Quá trình vận chuyển

mẫu giữ tại 2°C - 8°C hoặc dùng đá khô trong trường hợp đã bảo quản mẫu tại nhiệt độ -70°C.

- Kiểm tra chất lượng mẫu: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, chất lượng tốt, đủ thể tích mẫu cho xét nghiệm.

- Kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hay phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.1 của hướng dẫn này.

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

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

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

- Hóa chất sinh phẩm sử dụng trong phản ứng sinh học phân tử phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định của hóa chất/sinh phẩm.

- Hóa chất sinh phẩm khi nhận về phải được kiểm tra, đánh giá chất lượng.

- Đánh giá chất lượng sinh phẩm:

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

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

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

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

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

## **3.2. Trong xét nghiệm**

### **3.2.1. Nội kiểm**

Tiến hành sử dụng mẫu chứng tại mỗi lần chạy PCR và kiểm soát mẫu chứng.

- Chứng âm:

- + Chứng âm phản ứng (NTC): phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR hoặc/và realtime RT-PCR.

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

- Chứng dương: ARN tách chiết từ vi rút Zika đã bất hoạt.

### **3.2.2. Đánh giá từ bên ngoài**

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

### **3.3. Sau xét nghiệm**

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

- Mẫu bệnh phẩm đã được mã hóa sẽ được cất vào hộp và lưu trong tủ lạnh âm sâu (thấp hơn hoặc bằng  $-70^{\circ}\text{C}$ ).

- Sau khi cất mẫu vào hộp nhân viên phòng xét nghiệm ghi lại thông tin của mẫu bệnh phẩm vào sổ lưu giữ mẫu.

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

- Thời gian lưu giữ mẫu tùy từng mục đích.

#### **3.3.2. Tiêu hủy bệnh phẩm**

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:

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

+ Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ.

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

- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.

- Hấp ước tại  $121^{\circ}\text{C}/30$  phút.

- Sau khi hoàn tất, kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt, các thông số trên máy đạt và lấy túi rác thải.

- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.

### **4. Đọc và đánh giá kết quả**

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

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

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

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

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

Tham khảo mục 5, Phần II, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm.

### **III. Phương pháp xét nghiệm xác định vi rút Zika bằng RT-PCR và realtime RT-PCR**

#### **1. Phạm vi áp dụng**

Qui trình xét nghiệm này được áp dụng cho việc xác định vi rút Zika trong mẫu bệnh phẩm hoặc dịch nuôi cấy.

#### **2. Nguyên lý**

##### **2.1. Nguyên lý của RT-PCR**

ARN của vi rút được phiên mã ngược thành cADN. Sau đó cADN được cho vào tuýp chứa dung dịch (dd) phản ứng PCR bao gồm cặp mồi đặc hiệu cho vi rút cúm, enzyme Taq ADN polymerase, dNTPs... Tuýp phản ứng được đặt vào máy luân nhiệt PCR để khuếch đại đoạn trình tự đích theo chương trình nhiệt được cài đặt sẵn. Quá trình tổng hợp gồm khoảng 30-35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước chính: (i) bước biến tính ở nhiệt độ khoảng 94°C - 95°C; (ii) bước gắn mồi ở nhiệt độ khoảng 50°C - 55°C; và (iii) bước kéo dài ở nhiệt độ 72°C. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose để phát hiện sự có mặt hay không của đoạn gen đích đã được khuếch đại.

##### **2.2. Nguyên lý của realtime RT-PCR**

Khác với RT-PCR thông thường, phương pháp này sử dụng một mẫu dò phát huỳnh quang (probe) có khả năng phát hiện sản phẩm PCR đặc hiệu trong quá trình tổng hợp sản phẩm.

Mẫu dò là một đoạn olionucleotit (vd: Taqman<sup>®</sup> probe) được gắn với một chất nhuộm phát tín hiệu huỳnh quang ở đầu 5' (R), đầu kia thì được gắn với thuốc nhuộm dập tắt huỳnh quang (Q). Khi mẫu dò còn nguyên vẹn, Q có vai trò nhận năng lượng phát ra từ R (hiệu ứng chuyển năng lượng huỳnh quang). Nếu có trình tự đích, mẫu dò và mồi sẽ gắn vào khuôn, quá trình tổng hợp bắt đầu. Trong quá trình tổng hợp, enzym Taq ADN polymerase với hoạt tính exonuclease sẽ cắt các nucleotid của mẫu dò từ đầu 5', giải phóng R khỏi Q, làm tăng tín hiệu huỳnh quang của R. Càng nhiều sản phẩm tạo thành thì càng nhiều mẫu dò bị phân cắt và tín hiệu của R phát ra càng nhiều. Mắt đọc tín hiệu huỳnh quang của máy sẽ thu tín hiệu R, xử lý bằng phần mềm và đưa ra kết quả cuối cùng.

#### **3. An toàn sinh học**

- Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về an toàn sinh học theo quy định hiện hành đối với Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp II.

- Thuốc nhuộm ethidium bromide là một chất độc có thể gây ung thư cho người và động vật. Do đó, khi sử dụng hóa chất này phải mang găng tay và kính bảo hộ. Dung dịch sau khi sử dụng phải cho chảy qua than hoạt tính trước khi đổ bỏ hoặc có biện pháp xử lý chuyên biệt khác.

- Tham khảo các thuốc nhuộm khác an toàn như Sybr Green, GelRed, v.v.



## 4. Thực hiện xét nghiệm

### 4.1. Mẫu bệnh phẩm

#### 4.1.1. Loại mẫu:

- Mẫu máu thu thập trong vòng 5 ngày kể từ ngày khởi phát, không có chất chống đông, (tách huyết thanh) cần thể tích tối thiểu 3-5 ml máu tĩnh mạch.

- Mẫu nước tiểu trong vòng 20 ngày kể từ ngày khởi phát cần thể tích tối thiểu 5 - 10 ml.

- Mẫu tinh dịch trong trường hợp có chỉ định cần thể tích tối thiểu 500 $\mu$ l.

Chú ý: Mẫu huyết thanh rất có giá trị chẩn đoán Zika, nếu xét nghiệm các loại mẫu khác thì phải tiến hành xét nghiệm song song với mẫu huyết thanh.

Bệnh phẩm bảo đảm chất lượng đầu vào theo mục 3.1.1 hướng dẫn này.

#### 4.1.2. Tách chiết mẫu bệnh phẩm:

Tách chiết ARN tổng số theo hướng dẫn của bộ **QIAamp Viral RNA mini Kits** (tham khảo Mục 4.1.3, Phần III, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm). Thao tác được thực hiện trong tủ an toàn sinh học cấp 2 tại phòng tách chiết.

## 4.2. Tiến hành xét nghiệm bằng phương pháp RT-PCR

### 4.2.1. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

#### a) Pha cặp môi

**Bảng 2: Bộ môi cho phản ứng RT-PCR**

Môi	Tên môi	Trình tự ( 5'-3' )
Cặp môi ZIKA 1	ZIKVF	GCTGGDGCRGACACHGGRACT
	ZIKVR	RTCYACYGCCATYTGGRCTG
Cặp môi ZIKA 2	ZIKVF9027a	CCTTGGATTCTTGAACGAGGA
	ZIKVR9197c	AGAGCTTCATTCTCCAGATCAA

- Trả lại nước khử ion theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đạt nồng độ gốc.

- Nồng độ môi sau đó được pha từ nồng độ gốc và tính theo đơn vị nmole (ghi trên tuýp môi đông khô).

- Chia ra các tuýp có thể tích 300  $\mu$ l/1 loại môi và bảo quản tại -20°C.

#### b) Pha dung dịch phản ứng cho RT-PCR

- Thao tác được thực hiện tại tủ thao tác PCR phòng chuẩn bị dung dịch phản ứng. Sinh phẩm dùng trong phản ứng RT-PCR: QIAGEN Onestep RT-PCR hoặc tương đương.

- Xếp các hoá chất, sinh phẩm cần sử dụng lên hộp tích lạnh theo thứ tự trong bảng pha dung dịch phản ứng

- Đánh dấu tuýp 1,5 ml hoặc tuýp 0,5 ml dùng để trộn sinh phẩm và đặt lên hộp tích lạnh.

- Xác định số lượng phản ứng (N) cần làm:  $N = n + 1$  (với n: là tổng số mẫu xét nghiệm cộng với 3 mẫu chứng).

- Xác định số lượng mẫu cần xét nghiệm (n) và pha hỗn hợp phản ứng cho RT PCR theo bảng sau:

**Bảng 3: Thành phần pha sinh phẩm**

T	Sinh phẩm	Nồng độ	Thể tích (μl)	Thể tích cho N phản ứng (μl)
1	Đệm PCR x5		4	4 x N
2	Enzym		0,8	0,8 x N
3	dNTPs	10mM	0,8	0,8 x N
4	Mồi xuôi	50μM	0,2	0,2 x N
5	Mồi ngược	50μM	0,2	0,2 x N
6	Nước cất tinh sạch		9	9 x N
<b>Tổng</b>			<b>15</b>	
7	ARN mẫu		5	5
<b>Tổng</b>			<b>20</b>	

**c) Pha thạch điện di**

- Pha dung dịch đệm TBE 10X

- + Tris Base 108 g
- + Axít Boric 55 g
- + Nước cất 600 ml
- + Hòa tan Tris Base và Boric acid trong nước
- + Thêm EDTA 0.5M, pH8 20 ml
- + Thêm nước cất cho đủ 1000 ml

+ Kiểm tra pH trong khoảng 8 – 8,3; nếu pH ngoài khoảng này thì phải pha lại, không chỉnh pH bằng hóa chất vì sự thay đổi nồng độ ion sẽ ảnh hưởng đến sự di chuyển của ADN trong bản thạch khi điện di.

+ Hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C/ 20 phút

+ Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- Pha dung dịch đệm TBE 1X:

Khi sử dụng lấy 100ml TBE 10X pha với 900ml nước cất thành dung dịch TBE 1X, bảo quản ở nhiệt độ phòng.

**Bảng 4: Số lượng thành phần Agarose được chuẩn bị**

Thạch Agarose	Nồng độ 2,5%
TBE 1x (ml)	100
Agarose (g)	2,5
Ethidium bromide 10mg/ml (μl)	10

- Nồng độ hóa chất được pha theo hướng dẫn tại bảng 4.

- Cách đổ thạch:

+ Đổ thạch bằng khay điện di có cài sẵn rãnh lược.

+ Đo lượng Agarose và TBE phụ thuộc vào nồng độ thạch và số lượng khuôn thạch cần chuẩn bị được tính theo bảng 4. Ví dụ: Chuẩn bị 100 ml thạch 2,5%: cần 2,5 g Agarose bột và 100ml TBE. Sau đó cho Agarose bột và dung dịch TBE vào cốc thủy tinh. Làm tan Agarose bằng lò vi sóng trong khoảng 3 - 4 phút, đảm bảo Agarose tan hoàn toàn.

+ Để nguội khoảng 50 - 60°C rồi cho 10 µl Ethidium bromide lắc đều, đổ dung dịch Agarose này vào khuôn điện di có cài sẵn rãnh lược. Sau khoảng 60 phút ở nhiệt độ phòng, khi bản thạch đã đông, gỡ nhẹ nhàng rãnh lược ra. Bảo quản thạch ở 4°C.

#### 4.2.2 Các bước tiến hành thực hiện phản ứng RT-PCR

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

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

- Cho các mẫu chứng vào tuýp tương ứng. Mẫu chứng dương: được thực hiện tại tủ An toàn sinh học cấp II.

- Khởi động và kiểm tra chương trình trước khi chạy máy luân nhiệt cổ điển theo yêu cầu xét nghiệm.

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

**Bảng 5: Thông số chu trình nhiệt RT-PCR Zika cặp môi 1**

	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp (lần)	Tên chương trình
Cặp môi Zika 1	50	30:00	1	Zika – RT 1
	95	15:00		
	95	0:30	}35	
	55	0:30		
	72	0:45		
	72	7:00	1	
	10	∞		

**Bảng 6: Thông số chu trình nhiệt RT-PCR Zika cặp môi 2**

	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ lặp (lần)	Tên chương trình
Cặp môi Zika 2	50	30:00	1	Zika – RT 2
	95	15:00		
	94	0:15	}35	
	57	0:25		
	72	0:20		
	72	5:00	1	
	10	∞		

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

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

#### 4.2.3 Các bước tiến hành điện di sản phẩm RT-PCR

- Chuyển sản phẩm PCR vào thạch.  
 - Đặt thạch vào bể điện di theo đúng chiều dòng điện từ âm sang dương rồi cho TBE 1X ngập bản thạch sao cho dung dịch đệm cách mặt thạch từ 1-2mm.

- Cho 1 µl đệm đặt mẫu 6X (Loading Dye 6X) vào từng giếng của đĩa microtitre hoặc trên giấy parafilm với số lượng tương ứng với số mẫu cần phân tích.

- Trộn 9 µl mỗi sản phẩm PCR với 1 µl đệm đặt mẫu 6X.

- Trộn 4 - 5 µl thang chuẩn ADN 100bp hoặc 1000 bp với 1 µl đệm đặt mẫu 6X.

- Chuyển dung dịch đã được trộn với nhau vào trong các giếng của bản thạch.

- Đóng nắp của bể điện di, chọn dòng điện 110V và thời gian 30 phút.

- Tắt máy điện di, chuyển thạch sang máy đọc.

- Soi và chụp ảnh.

- Đặt bản thạch ngay ngắn trên máy đọc, bật đèn tím để đọc bản thạch và chụp ảnh.

#### 4.3. Tiến hành xét nghiệm bằng phương pháp realtime RT-PCR

##### 4.3.1. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

##### a) Pha bộ môi cho phản ứng realtime RT-PCR

**Bảng 7: Trình tự các cặp môi và probe chẩn đoán Zika**

Môi và probe		Trình tự (5'-3')	Nồng độ
Môi nhóm chung	Zika1087	CCGCTGCCCAACACAAG	100µM
	Zika1163c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGAC AT	100µM
	Zika1108FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCA GACTCTCAA	10µM
Môi nhóm Asian	Zika4481	CTGTGGCATGAACCCAATAG	100µM
	Zika4552c	ATCCCATAGAGCACCACTCC	100µM
	Zika4507cFAM	CCACGCTCCAGCTGCAAAGG	10µM

- Trả lại nước khử ion theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đạt nồng độ gốc.

- Nồng độ môi sau đó được pha từ nồng độ gốc và tính theo đơn vị nmole (ghi trên tuýp môi đông khô).

- Chia ra các tuýp có thể tích 300µl/1 loại môi và bảo quản tại -20°C.

- Chẩn đoán Zika bằng phương pháp realtime RT PCR nên sử dụng cặp môi chung trước. Nếu trường hợp nghi ngờ thì ta tiếp tục sử dụng cặp môi nhóm Asian.

#### **b) Pha dung dịch phản ứng realtime RT-PCR**

- Thao tác được thực hiện tại tủ thao tác PCR phòng chuẩn bị dung dịch phản ứng. Sinh phẩm dùng trong phản ứng realtime RT-PCR: SuperScrip™III Platium One-Step Quantitative RT- PCR hoặc tương đương.

- Xếp các hoá chất, sinh phẩm cần sử dụng lên hộp tích lạnh theo thứ tự trong bảng pha dung dịch phản ứng.

- Đánh dấu tuýp 1,5 ml hoặc tuýp 0,5 ml dùng để trộn sinh phẩm và đặt lên hộp tích lạnh.

- Xác định số lượng phản ứng (N) cần làm:  $N = n + 1$  (với n: là tổng số mẫu xét nghiệm cộng với 3 mẫu chứng).

- Xác định số lượng mẫu cần xét nghiệm (n) và pha hỗn hợp phản ứng theo bảng sau:

**Bảng 8: Thành phần pha sinh phẩm cho phản ứng realtime RT-PCR**

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (µl)/1 pư	Thể tích cho N phản ứng (µl)
1	2x Reagent mix		12,5	12,5xN
2	Superscrip III RT/Platium Taq Mix		0,5	0,5xN
3	Môi xuôi	100 µM	0,2	0,2xN
4	Môi ngược	100 µM	0,2	0,2xN
5	Probe	10 µM	0,25	0,25xN
6	Nước cất tinh sạch (Nuclease Free Water)		6,35	6,35xN
	<b>Tổng</b>			<b>20</b>
7	ARN		5	
	<b>Tổng</b>			<b>25</b>

#### **4.3.2 Các bước tiến hành phản ứng realtime RT-PCR**

- Chuẩn bị biểu mẫu kết quả xét nghiệm realtime RT-PCR.

- Cho 5µl mẫu ARN bệnh phẩm vào tuýp chứa hỗn hợp phản ứng realtime RT-PCR, ly tâm nhanh và giữ trong giá tích lạnh. Một mẫu làm hai tuýp.

- Cho các mẫu chứng vào tuýp tương ứng. Mẫu chứng dương: được thực hiện tại tủ an toàn sinh học cấp II.

- Sau khi tra mẫu phải nhập mã số mẫu vào sơ đồ vị trí khung 96 giếng.

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

- Cài đặt chương trình cho máy realtime PCR.

**Bảng 9: Thông số chu trình nhiệt realtime RT-PCR Zika**

	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp
Zika	50	30:00	} x 1
	95	2:00	
	95	0:15	} x 45
	60	1:00	
	Thu tín hiệu huỳnh quang		
	10	∞	

- Khởi động chương trình theo yêu cầu xét nghiệm.

- Tạo tên tệp và lưu giữ dữ liệu.

### 5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

#### 5.1. Đọc kết quả xét nghiệm:

##### 5.1.1. Đọc kết quả xét nghiệm RT-PCR

- Chứng dương: có băng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế.

- Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): không có băng đặc hiệu.

- Mẫu dương tính: sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước bằng kích thước chứng dương.

- Mẫu âm tính: là sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.

**Bảng 10: Kích thước sản phẩm PCR đặc hiệu của vi rút Zika**

Vi rút Zika	Độ dài sản phẩm khuếch đại
Cặp mồi 1	364 bp
Cặp mồi 2	192 bp

##### 5.1.2. Đọc kết quả xét nghiệm realtime RT-PCR

- Chứng âm: không có tín hiệu huỳnh quang hoặc có tín hiệu huỳnh quang sau chu kỳ 38.

- Chứng âm tách chiết: không có tín hiệu huỳnh quang hoặc có tín hiệu huỳnh quang sau chu kỳ 38.

- Chứng dương: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 38 của phản ứng.

- Kết quả của mẫu bệnh phẩm:

+ Nếu hai tuýp có giá trị Ct dưới 38 thì kết luận dương tính.

+ Nếu hai tuýp không có tín hiệu huỳnh quang thì kết luận âm tính.

+ Nếu một trong hai tuýp có giá trị Ct dưới 38 thì kết luận nghi ngờ.

+ Các mẫu dương tính và nghi ngờ với một cặp mồi đều phải xét nghiệm lại với cặp mồi thứ hai để khẳng định kết quả.

## 5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Nếu chứng âm phản ứng dương tính, chứng âm tách chiết âm tính thì làm lại từ khâu pha mix. Nếu chứng âm phản ứng âm tính, chứng âm tách chiết dương tính thì làm lại từ khâu tách chiết.

Kết quả không cho kết quả rõ ràng hoặc trong trường hợp cần khẳng định chính xác kết quả, phòng xét nghiệm có thể yêu cầu lấy lại bệnh phẩm và xét nghiệm theo thường quy của phòng từ bước nhận bệnh phẩm hoặc phòng xét nghiệm sẽ xét nghiệm bằng phương pháp còn lại.

- Kết quả được kết luận là dương tính nếu:

- + Mẫu chứng âm có kết quả âm tính.
- + Mẫu chứng dương có kết quả dương tính.
- + Mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính.

- Kết quả được kết luận là âm tính nếu:

- + Mẫu chứng âm có kết quả âm tính.
- + Mẫu chứng dương có kết quả dương tính.
- + Mẫu bệnh phẩm có kết quả âm tính.

- Kết quả không được phép kết luận nếu:

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

+ Mẫu chứng dương có kết quả âm tính với RT-PCR hay các mẫu chứng không có giá trị Ct rõ ràng với realtime RT-PCR.

## 5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành bảng kết quả chẩn đoán Zika.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo Trưởng phòng thí nghiệm.

## IV. Tài liệu tham khảo

1. Mariko Tanaka (1993), *Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction*, Journal of Virological Methods, Vol 14 pp311-322.

2. Michelle N.D. Balm, Chun Kiat Lee, Hong Kai Lee, Lily Chiu, Evelyn S.C. Koay, and Julian W. Tang (2012), *A diagnostic Polymerase Chain Reaction Assay for Zika Virus*, Medical Virology, Vol 84(9) pp 1501-1505.

3. Oumar Faye, Ousmane Faye, Anne Dupressoir, Manfred Weidmann, Mady Ndiaye, Amadou Alpha Sall (2008), *One-step RT-PCR for detection of Zika virus*, Journal of Clinical Virology, Vol 43(1) pp 96-101.

4. Robert S. Lanciotti, Olga L. Kosoy, Janeen J. Laven, Jason O. Velez, Amy J. Lambert, Alison J. Johnson, Stephanie M. Stanfield, and Mark R. Duf (2008), *Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007*, EID journal, Vol 14 pp 1232-1239.

5. *QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Handbook. Hướng dẫn sử dụng kit tách chiết RNA.*
6. *QIAGEN One Step RT-PCR Kit Handbook, 2002*
7. *SuperScript III Platinum One Step qRT-PCR kit*



## **BỆNH SỐT RÉT (Human malaria)**

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

### **I. Mô tả chung**

Bệnh sốt rét là bệnh truyền nhiễm do ký sinh trùng Plasmodium ở người gây nên. Bệnh lây theo đường máu, chủ yếu là do muỗi Anopheles truyền. Có 5 loài ký sinh trùng sốt rét gây bệnh cho người: *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*; *Plasmodium ovale* và *Plasmodium knowlesi*. Bệnh thường biểu hiện bằng những cơn sốt rét điển hình với 3 triệu chứng: rét run, sốt, vã mồ hôi. Bệnh tiến triển có chu kỳ và có hạn định nếu không bị tái nhiễm. Ký sinh trùng sốt rét gây miễn dịch đặc hiệu nhưng không bền vững. Bệnh lưu hành địa phương, trong những điều kiện thuận lợi có thể gây thành dịch, hiện chưa có vắc xin phòng bệnh, có thuốc điều trị đặc hiệu và có thể phòng chống được. Ở nước ta bệnh lưu hành chủ yếu ở vùng rừng, đồi, núi ven biển nước lợ; bệnh xảy ra quanh năm nhưng chủ yếu vào mùa mưa.

Trường hợp xác định mắc sốt rét là trường hợp có ký sinh trùng sốt rét trong máu được xác định bằng xét nghiệm lam máu nhuộm giem sa, xét nghiệm chẩn đoán nhanh phát hiện kháng nguyên hoặc xét nghiệm bằng kỹ thuật sinh học phân tử - PCR.

### **II. Yêu cầu chung**

#### **1. Nhân sự**

- Có ít nhất 02 cán bộ có chuyên môn chuyên ngành xét nghiệm đa khoa, vi sinh hoặc ký sinh trùng, và đã được đào tạo về các kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán sốt rét.

- Tất cả nhân viên kỹ thuật xét nghiệm cần được đào tạo về sử dụng trang thiết bị, đào tạo về thực hành ATSH và thực hành vi sinh chuẩn, đào tạo về đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Nhân viên xét nghiệm được đào tạo các nội dung sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

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

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

#### **2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị**

##### **2.1. Cơ sở vật chất:**

- Phòng xét nghiệm cần đáp ứng về điều kiện an toàn sinh học, hệ thống quản lý chất lượng phòng xét nghiệm (PXN) theo quy định hiện hành.

Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật PCR cần 4 khu vực/phòng xét nghiệm riêng, bao gồm: khu vực/phòng pha dung dịch phản ứng (1), khu vực/phòng tách chiết ADN (2), khu vực/phòng đặt máy PCR (3) và khu

vực/phòng điện di (4). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) ⇒ (2) ⇒ (3) ⇒ (4).

- Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật realtime PCR cũng tương tự như PCR, tuy nhiên không có khu vực/phòng điện di.

## 2.2. Trang thiết bị

**Bảng 1: Trang thiết bị**

Tên thiết bị	Số lượng TB cần dùng/KTXN			
	Soi kính hiển vi	XN nhanh	PCR đa môi bán lồng/PCR lồng	realtime PCR
Máy ly tâm thường		01 cái	01 cái	01 cái
Micropipette	01 cái	01 bộ	03 bộ	03 bộ
Tủ lạnh bảo quản mẫu	01 cái	01 cái	01 cái	01 cái
Tủ lạnh bảo quản sinh phẩm	01 cái	01 cái	01 cái	01 cái
Tủ ATSH cấp 2			01 cái	01 cái
Nồi hấp ướ	01 cái	01 cái	01 cái	01 cái
Máy ly tâm nhỏ để bàn			02 cái	02 cái
Máy ly tâm lạnh tốc độ tối đa 14 000 vòng/phút			01 cái	01 cái
Máy vortex			02 cái	02 cái
Giá tích lạnh			02 cái	02 cái
Giá ống 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml		01 cái	02 cái	02 cái
Tủ thao tác PCR			01 cái	01 cái
Máy luân nhiệt PCR			01 cái	
Máy realtime PCR				01 cái
Máy ủ nhiệt			01 cái	01 cái
Máy làm đá vảy			01 cái	01 cái
Hệ thống máy điện di			01 bộ	
Lò vi sóng			01 cái	
Tủ lạnh âm sâu bảo quản mẫu huyết thanh			01 cái	01 cái
Tủ lạnh âm sâu bảo quản mẫu DNA			01 cái	01 cái
Tủ lạnh -20 <sup>0</sup> C bảo quản sinh phẩm	01 cái	01 cái	01 cái	01 cái
Máy đo pH	01 cái		01 cái	01 cái
Giá lam	02 cái			
Cân điện tử	01 cái		02 cái	01 cái

- Hồ sơ thiết bị gồm: hồ sơ xác nhận ban đầu của thiết bị, lý lịch thiết bị, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Có danh sách thiết bị, hướng dẫn sử dụng thiết bị.

- Đào tạo cho các nhân viên vận hành thiết bị theo đúng hướng dẫn.

### **3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm**

#### **3.1. Trước xét nghiệm:**

##### **3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu đầu vào:**

- Loại mẫu: Máu toàn phần được thu thập từ đối tượng người dân sống trong vùng sốt rét lưu hành, hoặc nghi ngờ mắc sốt rét máu toàn phần trong ống chống đông, mẫu máu khô trên giấy thấm, lam máu nhuộm giemsa.

- Bảo quản mẫu: Mẫu máu toàn phần, máu được bảo quản trong chất chống đông phải được bảo quản ở điều kiện 2-8°C chuyển về phòng xét nghiệm và thực hiện xét nghiệm trong vòng 3 ngày; bảo quản ở nhiệt độ -20°C đến -70°C tối đa 01 năm. Mẫu máu khô trên giấy thấm và lam máu được bảo quản ở nhiệt độ môi trường, chống mốc, chống tác động của côn trùng gây hại.

- Kiểm tra chất lượng mẫu: mẫu không bị đổ vỡ, đúng loại mẫu cho yêu cầu xét nghiệm, mẫu đảm bảo nhiệt độ khi vận chuyển, chất lượng tốt, đủ thể tích mẫu cho xét nghiệm.

- Kiểm tra thông tin trên tuýp mẫu có trùng khớp với thông tin bệnh nhân trong phiếu gửi mẫu hay phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Thông báo ngay cho đơn vị gửi bệnh phẩm trong trường hợp bệnh phẩm được gửi không đảm bảo chất lượng và lưu hồ sơ. Nếu hủy mẫu thì tuân theo quy trình hủy mẫu theo mục 3.3.1 của hướng dẫn này.

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

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

- Hàng năm lập danh mục các máy móc TTB cần hiệu chỉnh, hiệu chuẩn, bảo dưỡng: bao gồm các thông tin về tên trang thiết bị, tiêu chí cần hiệu chỉnh, hiệu chuẩn, thời điểm, tần suất hiệu chỉnh, hiệu chuẩn.

- Đấu thầu lựa chọn các nhà thầu có đủ năng lực để tiến hành các hoạt động trên.

- Hiệu chuẩn thiết bị, bảo dưỡng các trang thiết bị: Đặc biệt là các trang thiết bị phục vụ cho hoạt động thu thập và bảo quản, lưu trữ mẫu: như tủ an toàn sinh học, tủ lạnh bảo quản mẫu, các thiết bị đo nhiệt độ, độ ẩm môi trường.

- Đánh giá thiết bị sau hiệu chuẩn.

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

- Hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao sử dụng trong các xét nghiệm phải được bảo quản theo khuyến cáo của nhà sản xuất để đảm bảo tính ổn định của hóa chất/sinh phẩm.

- Hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao khi nhận về phải được kiểm tra, đánh giá chất lượng.

- Đánh giá chất lượng hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao:
- + Các loại hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao khi nhận về đều phải được kiểm tra.
- + Quan sát bằng mắt thường xem các lọ hoá chất, sinh phẩm, vật tư có bất thường không, ví dụ như bột nắp, rò rỉ, vẩn đục, thay đổi màu sắc.
- + Kiểm tra mỗi lô hóa chất, sinh phẩm theo bộ mẫu gồm 2 mẫu dương và 1 mẫu âm của tác nhân mà phòng xét nghiệm đang thực hiện theo quy trình xét nghiệm.
- + Pha chế hóa chất, sinh phẩm theo hướng dẫn an toàn hóa chất sinh phẩm và hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Vật tư hóa chất được quản lý theo đúng theo quy định và đảm bảo sự sẵn có cho việc thực hiện xét nghiệm.

### **3.2. Trong xét nghiệm**

#### **3.2.1. Nội kiểm**

Thực hiện nội kiểm định kỳ trong: sử dụng các chứng chuẩn (chứng âm, chứng dương, chứng nội kiểm), bộ lam mẫu trong mỗi lần tiến hành thử nghiệm, xét nghiệm.

Kết quả của các xét nghiệm chỉ được ghi nhận khi:

- Chứng dương: cho kết quả dương tính
- Chứng âm: cho kết quả âm tính
- Chứng nội kiểm: cho kết quả đúng yêu cầu của bộ sinh phẩm

#### **3.2.2. Đánh giá từ bên ngoài**

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

### **3.3. Sau xét nghiệm:**

#### **3.3.1. Bảo quản, lưu trữ mẫu bệnh phẩm:**

- Lưu trữ các mẫu vật được xác định theo quy trình chuẩn
- Tùy theo loại mẫu xét nghiệm mà phương thức xử lý mẫu và bảo quản mẫu là khác nhau.
- Mẫu máu đã được trộn đều trong EDTA chỉ bảo quản ở 2°C – 8°C không quá 24 giờ, không để mẫu máu chưa xử lý ở trong tủ đá hoặc tủ âm sâu. Trong trường hợp lưu giữ lâu hơn phải xử lý mẫu và bảo quản ở -20°C.
- Mẫu máu thu thập trên giấy thấm Whatman có chất hút ẩm được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ không quá 30°C trong thời gian 6 tháng. Nếu cần bảo quản lâu hơn thì phải bỏ chất hút ẩm đi và giữ ở nhiệt độ -20°C.
- Mẫu ADN sau tách chiết được bảo quản ở nhiệt độ 2°C -8°C trong 10 ngày hoặc -20°C trong thời gian lưu giữ lâu hơn.
- Mẫu sau khi được xử lý có thể chia nhỏ ra các ống mới để thuận tiện cho việc sử dụng và lưu trữ, tất cả các ống mới phải có mã giống như mẫu gốc ban đầu hoặc chứa các thông tin để có thể truy ra nguồn gốc mẫu ban đầu.
- Sau khi tiến hành xét nghiệm các đơn vị phải lưu giữ phần còn lại của mẫu xét nghiệm.

- Phần mẫu lưu phải bảo quản ở các điều kiện giống như đã bảo quản mẫu ban đầu. Các thông số về điều kiện bảo quản mẫu và môi trường phải được ghi vào sổ theo dõi. Tách biệt với các mẫu sau xét nghiệm với mẫu trước xét nghiệm.

- Mẫu trả lại khách hàng: nếu khách hàng yêu cầu trả lại mẫu thì sau khi xét nghiệm trả lại mẫu cho khách hàng và ghi nhận vào sổ theo dõi mẫu. Mẫu xét nghiệm phải được lưu trong điều kiện thích hợp để có thể thực hiện xét nghiệm lại khi có yêu cầu.

### **3.3.2. Thanh lý mẫu/ Hủy mẫu**

- Hủy mẫu bệnh phẩm trong các trường hợp sau:

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

+ Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ.

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

- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.

- Hấp ướm tại 121°C/30 phút.

- Sau khi hoàn tất, kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt, các thông số trên máy đạt và lấy túi rác thải.

- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.

### **4. Đọc và đánh giá kết quả**

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

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

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

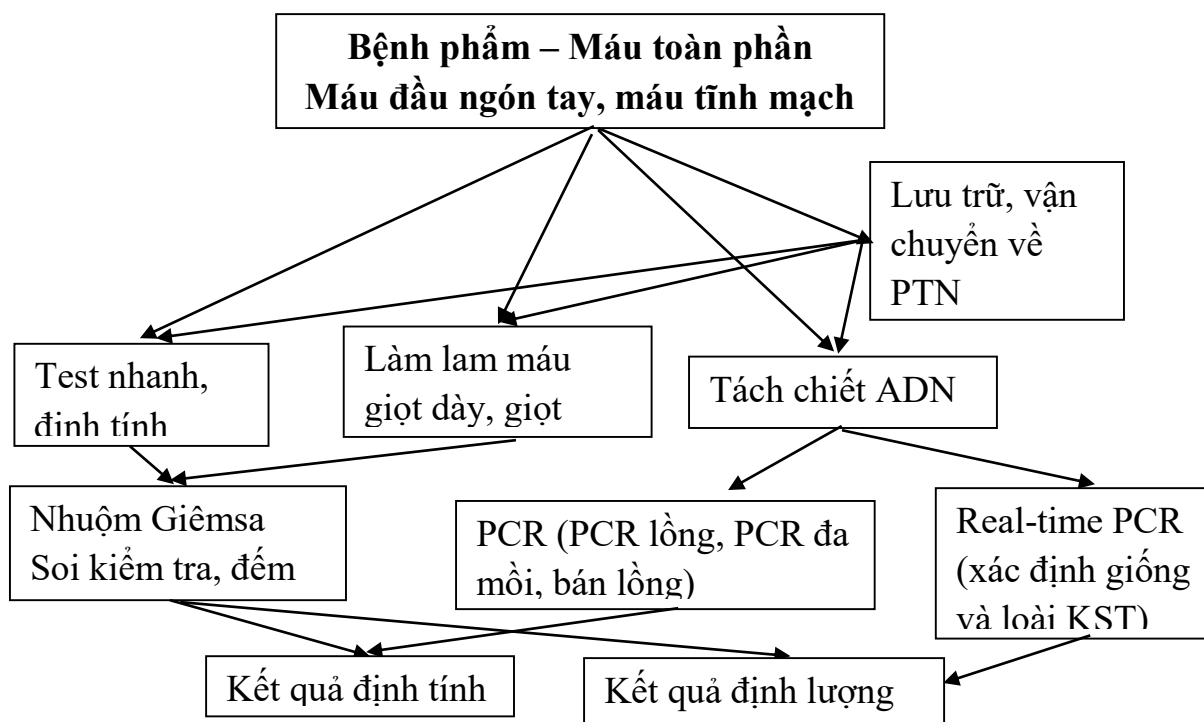
- Có quy định cụ thể cho trả kết quả cho các trường hợp thường quy, kết quả bất thường/ báo động, khẩn, tạm thời, và quy trình xử lý khi trả kết quả nhầm, chậm.

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

Tham khảo mục 5, Phần II, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm.

## **III. Phương pháp xét nghiệm**

Bệnh phẩm làm xét nghiệm xác định nhiễm ký sinh trùng sốt rét là máu toàn phần, ngoài ra hiện nay đang phát triển các xét nghiệm có mẫu bệnh phẩm là phân, nước tiểu và nước bọt. Các phương pháp xét nghiệm xác định ký sinh trùng sốt rét được thể hiện trong sơ đồ bên dưới



**Sơ đồ 1. Các phương pháp xét nghiệm dùng cho chẩn đoán ban đầu và khẳng định có ký sinh trùng sốt rét.**

### **1. Phương pháp xét nghiệm lam máu nhuộm giem sa soi trên kính hiển vi quang học**

Đây là kỹ thuật ban đầu, phổ biến nhất trong phát hiện ký sinh trùng sốt rét; hiện tại được coi là chuẩn vàng trong việc phát hiện KSTSR. Kết quả xét nghiệm được trả lời sớm trong vòng 2 giờ sau khi lấy mẫu. Nếu lần đầu xét nghiệm âm tính, mà vẫn còn nghi ngờ người bệnh bị sốt rét thì phải xét nghiệm thêm 2-3 lần nữa, mỗi lần cách nhau 8 giờ hoặc lấy mẫu vào thời điểm người bệnh đang lên cơn sốt. Ngưỡng phát hiện khoảng 50-100 KST/ $\mu$ máu đầu ngón tay. Kỹ thuật có tiêu chuẩn xét nghiệm chuẩn của WHO, có các hướng dẫn đánh giá theo quy định của WHO.

#### **1.1. Phạm vi áp dụng**

Phương pháp này áp dụng cho việc xét nghiệm ký sinh trùng sốt rét trong mẫu máu mao mạch, thu thập từ đầu ngón tay; hoặc máu tĩnh mạch bằng cách nhận diện hình thái của ký sinh trùng sốt rét dưới kính hiển vi quang học.

#### **1.2. Nguyên lý**

Dựa vào sự khác biệt về hình thái các loài ký sinh trùng (kích thước, hình dạng, số lượng các cơ quan trong tế bào KST, màu sắc của nhân và nguyên sinh chất) dưới kính hiển vi để xác định và phân biệt các loài ký sinh trùng sốt rét gây bệnh trên người.

### **1.3. An toàn sinh học**

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về an toàn sinh học theo quy định hiện hành.

### **1.4. Thực hiện xét nghiệm**

#### **1.4.1. Mẫu bệnh phẩm**

- Máu đầu ngón tay: lau bỏ giọt máu đầu
- Máu tĩnh mạch bảo quản trong chất chống đông
- Một lam máu giọt dày: 6  $\mu$ l
- Một lam máu giọt mỏng cần: 2  $\mu$ l
- Máu nên được tiến hành làm lam máu ngay sau khi lấy máu, hoặc bảo quản tối đa ở nhiệt độ 2-8<sup>0</sup>C trong 48 giờ.

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

##### **a) Dụng cụ**

- Lam kính sạch;
- Lam kéo chuẩn (cạnh lam phẳng, nhẵn, vát 2 góc ở đầu lam);
- Kim chích máu vô khuẩn;
- Giấy thấm lam;
- Giấy lọc;
- Bút viết kính không phai;
- Hộp đựng lam;
- Hộp đựng bông (01 hộp bông khô, 01 hộp bông còn);
- Hộp đựng rác thải y tế;
- Máy sấy tóc (nếu có);
- Máy đếm;
- Ống đong loại 10ml, 500ml;
- Cốc có mỏ loại 50ml, 100ml;
- Đũa thủy tinh;
- Pipet nhựa loại 3ml;
- Phễu thủy tinh;
- Đồng hồ hẹn giờ;

##### **b) Hóa chất**

- Dầu soi;
- Giemsa mẹ;
- Dung dịch đệm PBS;
- Cồn Ethanol;
- Cồn Methanol;

#### **1.4.3. Các bước tiến hành**

##### **a) Kỹ thuật làm lam máu tìm ký sinh trùng sốt rét**

- Bước 1. Điền các thông tin cơ bản của bệnh nhân:
  - + Ghi đủ các thông tin cần thiết vào phiếu xét nghiệm KSTSR và sổ xét nghiệm KSTSR
  - + Dùng bút viết kính không phai ghi số hiệu của bệnh nhân vào ¼ đầu lam;

- Bước 2. Sát trùng nơi chích máu: dùng bông cồn sát khuẩn đầu ngón tay thứ tư (kể từ ngón cái), trẻ nhỏ sát khuẩn ở ngón chân cái theo vòng tròn từ trong ra ngoài và để khô tự nhiên.



**Hình 1: Sát trùng nơi chích máu**

- Bước 3. Chích máu: chích nhanh, sâu khoảng 2mm và dùng bông khô lau bỏ giọt máu đầu.



**Hình 2: Chích máu**

- Bước 4. Lấy máu: bóp nhẹ ngón tay để máu trào ra, lấy khoảng 2μl máu có kích thước bằng ● vào giữa lam kính và 6μl có kích thước ● bằng vào ¼ còn lại của lam kính. Dùng bông khô để cầm máu.



**Hình 3: Lấy máu**

- Bước 5. Dàn máu:

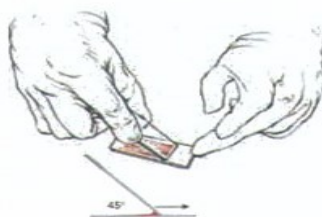
+ Với giọt máu mỏng:

Đặt lam máu trên mặt phẳng chắc chắn hoặc trên giá lam;

Đặt một cạnh của lam kéo máu lên lam kính có giọt máu tạo thành một góc 45°;

Kéo từ từ cho lam kéo máu chạm vào giọt máu, để cho máu lan theo giao tuyến của 2 lam kính;

Chờ cho máu lan ra gần hết cạnh của lam kéo máu, đẩy nhanh đều và nhẹ tay lam kéo máu về phía đầu kia của lam kính chứa máu;

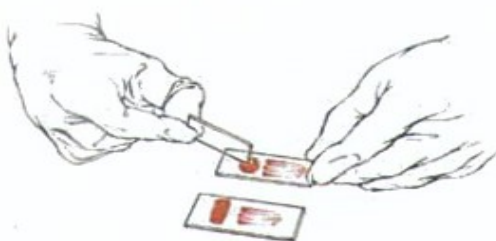


**Hình 4: Dàn máu giọt mỏng**

+ Với giọt máu dày:



Đặt tiêu bản máu trên mặt phẳng chắc chắn hoặc trên giá lam;  
Dùng một góc lam khác dàn máu theo 1 chiều, xoay tròn không quá 6 vòng,  
đường kính khoảng 1 cm.



**Hình 5: Dàn máu giọt dày**

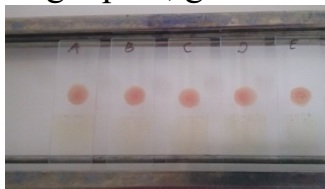
- Bước 6. Làm khô lam máu:
  - + Để khô lam máu tự nhiên trên một mặt phẳng hoặc bằng cách sấy lam (sấy nhẹ bằng máy sấy tóc ở mức nhỏ nhất, đặt lam kính cách đầu máy sấy 25 – 30 cm) tránh bụi, tránh côn trùng ăn máu;
  - + Sau khi giọt máu khô, dùng bút chì ghi số hiệu lam máu và ngày lấy máu vào phần dày nhất của giọt máu mỏng.



**Hình 6: Ghi số hiệu lam máu**

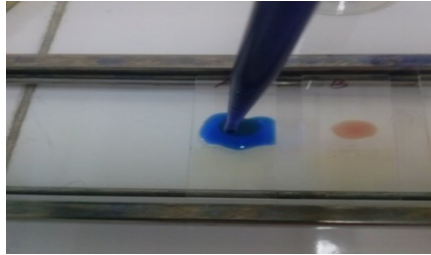
### **b) Kỹ thuật nhuộm lam máu tìm ký sinh trùng sốt rét**

- Bước 1. Cố định giọt máu mỏng:
  - + Để nghiêng lam máu  $45^\circ$ , giọt máu mỏng quay xuống dưới;
  - + Dùng pipet nhỏ cồn methylic lên trên giọt máu mỏng hoặc nhúng phần giọt máu mỏng vào cốc có cồn để 3 - 5 giây;
  - + Cắm lam máu lên giá cài lam, để khô tự nhiên.
- Bước 2. Pha dung dịch nhuộm:
  - + 01 lam giọt máu dày cần 01ml dung dịch Giemsa nhuộm;
  - + 01 lam giọt máu mỏng cần 1,5ml dung dịch Giemsa nhuộm.
  - + Pha dung dịch Giemsa 4%
  - + Pha dung dịch Giemsa 10%
- Bước 3. Nhuộm lam máu:
  - + Xếp lam lên giá nhuộm lam: khoảng cách giữa các lam cách nhau ít nhất 0,5 cm, giọt đàn quay về cùng 1 phía, giá lam để trên mặt phẳng;



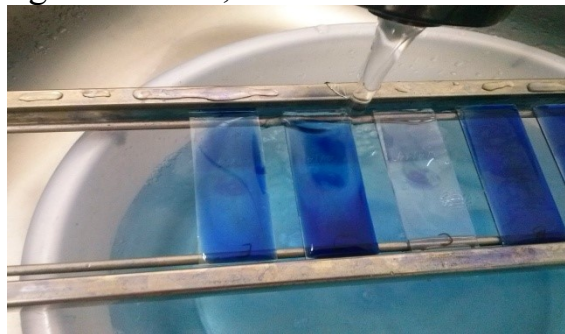
**Hình 7: Hình xếp lam máu trên giá**

- + Xếp lam lên giá nhuộm
- + Nhỏ dung dịch Giemsa đã pha lên toàn bộ phần lam có máu (Nhỏ hết lượng dung dịch Giemsa, không được chạm đầu pipet vào lam máu và tránh tạo bọt)



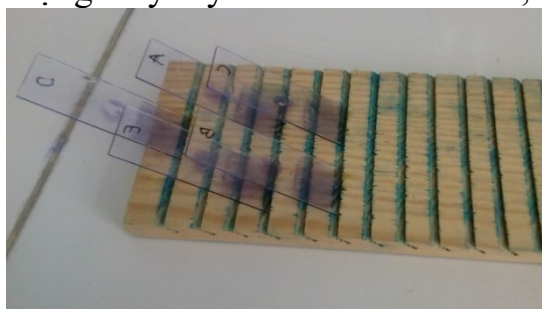
**Hình 8: Nhỏ dung dịch Giemsa lên mẫu**

- + Nhỏ dung dịch Giemsa nhuộm lên lam máu
- + Đặt đồng hồ hẹn giờ để tính thời gian nhuộm lam:
- + Thời gian nhuộm là 40 - 45 phút với nồng độ dung dịch Giemsa nhuộm 4%;
- + Thời gian nhuộm là 8 - 10 phút với nồng độ dung dịch Giemsa nhuộm 10%;
- Bước 4. Rửa lam sau khi nhuộm:
- + Đưa giá lam vào vòi nước chảy nhẹ, giọt đàn quay về phía vòi nước chảy cách vòi khoảng 3 đến 5 cm;



**Hình 9: đưa mẫu đã nhỏ dung dịch Giemsa dưới vòi nước chảy nhẹ**

- + Rửa lam sau khi nhuộm
- + Rửa đến khi nước trong hoặc hết vàng, cạn là được;
- + Cắm lam máu lên giá phơi lam (mặt có máu quay xuống dưới tránh bụi bẩn, ánh nắng trực tiếp) để khô tự nhiên. Trong trường hợp cần có kết quả nhanh có thể sử dụng máy sấy tốc để làm khô lam;



**Hình 10: đưa mẫu đã nhỏ dung dịch Giemsa dưới vòi nước chảy nhẹ**

+ Cắm lam lên giá sau khi nhuộm xong

### c) Kỹ thuật soi và đếm ký sinh trùng sốt rét

- Bước 1. Chuẩn bị:

+ Nhỏ 01 giọt dầu soi lên giọt máu dày và 01 giọt dầu soi vào phần đuôi của giọt máu mỏng trên lam kính;

+ Đặt lam kính lên mâm kính hiển vi, nhấn lam quay về phía tay trái;

+ Điều chỉnh lam máu về giữa mâm kính (thẳng trục quang học), soi giọt máu dày trước, giọt máu mỏng sau;

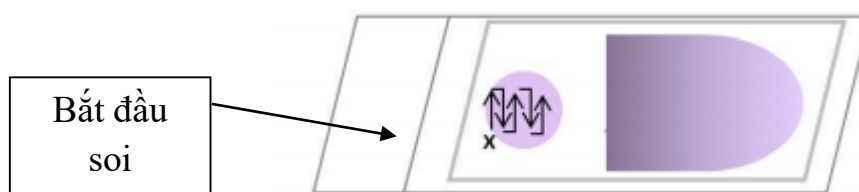
+ Lấy vi trường ở vật kính 40X;

+ Chuyển từ vật kính 40X sang vật kính 100X, điều chỉnh ốc vi cấp để lấy vi trường với hình ảnh rõ nét.

- Bước 2. Cách soi và đếm KSTSR trên lam máu:

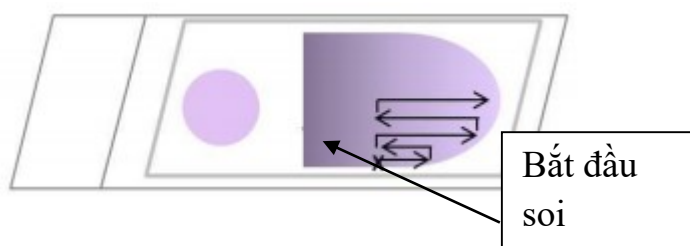
+ Cách soi và kết luận lam máu:

+ Di chuyển sa trượt để soi lam máu từ dưới lên trên, từ trái qua phải



**Hình 11:: Soi lam giọt máu dày**

+ Di chuyển sa trượt để soi lam máu từ trái qua phải từ dưới lên trên



**Hình 12: Soi lam giọt máu mỏng**

+ Với lam máu giọt mỏng cần ưu tiên soi ở 2/3 đuôi của lam máu;

+ Thời gian và số vi trường cần phải soi để kết luận 01 lam máu:

Với lam máu giọt dày soi 200 vi trường trong 10 phút nếu không phát hiện ký sinh trùng thì kết luận là: Không tìm thấy ký sinh trùng. Nếu tìm thấy ký sinh trùng thì dựa vào bảng phân loại hình thể trong bộ lam mẫu và trong bộ tranh ký sinh trùng để kết luận đó là loại ký sinh trùng loại nào;

Trong những trường hợp nghi ngờ bệnh nhân sốt rét khi soi 200 vi trường chưa phát hiện thấy ký sinh trùng sốt rét thì nên soi hết diện tích của phần lam có máu mới kết luận;

### d) Cách đếm KSTSR trên lam máu:

- Đếm thể vô tính ký sinh trùng sốt rét trên lam giọt máu dày:

+ Đếm tất cả các thể vô tính, đếm riêng biệt. Không đếm thể giao bào trừ trường hợp yêu cầu.

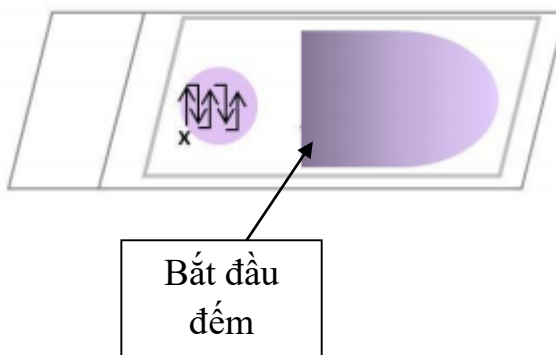
+ Phương pháp tính mật độ ký sinh trùng sốt rét trên 1 $\mu$ l máu, dựa vào số lượng bạch cầu chuẩn:

Số lượng bạch cầu chuẩn được quy định là 8.000 BC/ $\mu$ l;

Dùng 2 máy đếm: một máy đếm KST, một máy đếm bạch cầu;

Đếm số bạch cầu và số KST trên mỗi vi trường;

Đếm ký sinh trùng từ trái qua phải, từ dưới lên trên, cách 5 vi trường đếm 1 vi trường, để tránh bỏ sót hoặc lặp lại đảm bảo tính ngẫu nhiên trong quá trình đếm;



**Hình 13: Đếm ký sinh trùng trên lam giọt máu dày**

- Đếm ký sinh trùng trên lam giọt máu mỏng:

+ Chỉ đếm ký sinh trùng trên lam giọt máu mỏng khi không thể thực hiện được trên lam giọt máu dày. Phương pháp này còn được thực hiện khi ước tính mật độ KST quá dày trên 80.000 KST/ $\mu$ l, tương đương với 100 KST/ $\mu$ l trên lam giọt máu dày.

+ Thực hiện như bước 1 trên giọt máu dày.

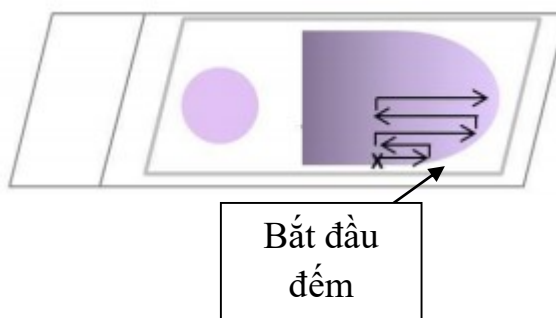
+ Cách đếm số lượng thể vô tính ký sinh trùng sốt rét trên giọt máu mỏng:

o Đếm ký sinh trùng ở 40 vi trường, số lượng hồng cầu ước tính trên mỗi vi trường khoảng 250 hồng cầu  $\rightarrow 40 \times 250 = 10.000$  hồng cầu;

o Dùng 2 máy đếm: một máy đếm KST, một máy đếm hồng cầu;

o Đếm toàn bộ số hồng cầu và số KST trong vi trường;

o Đếm ký sinh trùng từ trái qua phải, từ dưới lên trên, cách 5 vi trường đếm 1 vi trường, để tránh bỏ sót hoặc lặp lại đảm bảo tính ngẫu nhiên trong quá trình đếm;



**Hình 14. Đếm ký sinh trùng trên lam giọt máu mỏng**

- Bỏ lam máu ra khỏi mâm kính.
- Úp mặt lam máu có dầu lên giấy thấm.
- Lau vật kính dầu bằng giấy thấm tâm còn Ethylic.
- Đưa kính về tư thế nghỉ.
- Xếp lam máu vào giá, lưu trữ theo quy định.
- Thu dọn dụng cụ, vật tư thí nghiệm vào đúng vị trí theo quy định

của phòng xét nghiệm.

Ghi kết quả đếm vào mẫu

## 1.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

### 1.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

Đánh giá một lam máu đạt yêu cầu:

- Máu phải dàn đều, không quá dày hoặc quá mỏng, không có vết xước dọc ngang, không loang lổ;

- Soi trên kính hiển vi phải thấy một lớp hồng cầu dải đều xếp liền nhau không chồng lên nhau cũng không cách xa nhau (giọt mỏng). Các hồng cầu được dung dải hết, mỗi vi trường có từ 15 đến 20 bạch cầu (giọt dày);

- Giọt máu đạt tiêu chuẩn phải có kích thước 2,5cm theo chiều dài của lam và cách đều 2 mép lam 2mm (giọt mỏng) và máu dàn đều, không rạn nứt, đường kính khoảng 1 cm, cách đều 2 mép lam (giọt dày).

### 1.5.2. Phiên giải kết quả:

- Kỹ thuật viên ghi kết quả vào biểu mẫu như sau

- Nếu không tìm thấy ký sinh trùng sốt rét: âm tính (-).

- Nếu tìm thấy ký sinh trùng sốt rét, ghi kết quả theo thứ tự: loài, thể, mật độ ký sinh trùng sốt rét theo hệ thống dấu cộng.

Ví dụ:

- Ft<sup>+++</sup>s<sup>+</sup>g<sup>++</sup>
- Vt<sup>+++</sup>s<sup>+</sup>g<sup>+</sup>
- Ft<sup>++</sup>s<sup>+</sup>g<sup>+</sup>Vt<sup>++</sup>s<sup>+</sup>g<sup>+</sup>

- Trong một số tình huống cụ thể có thể áp dụng tính theo công thức ở dưới

**Bảng 2: Ví dụ về nội dung thông tin mẫu cần ghi**

TT	Số hiệu máu	Họ Tên	Kết quả đếm	KST	BC	P.f		P.v		P.o		P.m		P.k		Ghi chú
						TD	GB	TD	GB	TD	GB	TD	GB	TD	GB	
1	1A	A	4000	Ft	200	100										
2	2A	B	4040	Vt	200			101								
3	3A	C	4640	FtVt	200	56		60								

- Trên thực tế cũng có thể gặp những bệnh nhân cùng một lúc nhiễm hai hoặc nhiều loại ký sinh trùng thì kết luận là nhiễm phối hợp.

- Báo cáo kết quả ghi phương pháp được kèm theo biểu mẫu

- Đánh giá mật độ ký sinh trùng theo phương pháp đếm

- Đếm KSTSR trên lam giọt dày:

+ Nếu đếm được 200 bạch cầu mà số lượng KST  $\geq 100$  thì dừng lại và áp dụng công thức:

$$\text{Số lượng KSTSR đếm được} \times 8000 \\ \text{KSTSR}/\mu\text{l} = \frac{\text{Số lượng bạch cầu đã đếm}}{\text{Số lượng bạch cầu đã đếm}}$$

+ Nếu đếm 200 bạch cầu mà số lượng KST  $< 100$  phải tiếp tục đếm cho đến 500 bạch cầu mới áp dụng công thức trên để tính số KSTSR/ $\mu\text{l}$ ;

+ Trường hợp mật độ KSTSR trên lam nhiều: đếm chưa đủ 200 bạch cầu mà số lượng KSTSR  $\geq 500$  thì dừng lại và áp dụng công thức trên để tính số lượng KSTSR.

- Đếm KSTSR trên lam giọt mỏng:

+ Số lượng KST/ $\mu\text{l}$  máu trên lam giọt máu mỏng liên quan tới số lượng hồng cầu chuẩn (số lượng hồng cầu chuẩn theo WHO khoảng 5.000.000 hồng cầu/ $\mu\text{l}$ );

+ Công thức tính số ký sinh trùng/ $\mu\text{l}$  máu:

$$\text{KSTSR}/\mu\text{l} = \frac{\text{Số lượng KSTSR đếm được} \times 5.000.000}{10.000}$$

- Đánh giá mật độ ký sinh trùng theo hệ thống dấu cộng:

+ Phương pháp này chỉ áp dụng khi không thể thực hiện được phương pháp tính mật độ KSTSR/ $\mu\text{l}$  máu, với điều kiện 1 vi trường chuẩn có 15 – 20 bạch cầu;

+ Để xác định được mật độ KST, phải soi tối thiểu 100 vi trường; Phương pháp đánh giá mật độ ký sinh trùng theo hệ thống dấu cộng được thực hiện như sau:

+ = 1 – 10 KST/100 vi trường;

++ = 11 – 100 KST/100 vi trường;

+++ = 1 – 10 KST/ 1 vi trường;

++++ = trên 10 KST/ 1 vi trường;

### 1.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

Trường hợp kết quả xét nghiệm không rõ ràng như phần phiên giải ở trên, nếu nghi ngờ có thể yêu cầu thêm 2 kỹ thuật viên xét nghiệm lại lam máu (bước đọc dưới kính hiển vi). Kết quả cuối cùng được đưa ra khi có 2 kỹ thuật viên có kết quả giống nhau; đồng thời yêu cầu xét nghiệm kiểm định bằng các kỹ thuật khác như test nhanh hoặc PCR, realtime-PCR, nếu có 2/3 xét nghiệm có kết quả tương đồng thì kết luận theo kết quả này.

### 1.5.3. Ghi chép và báo cáo kết quả xét nghiệm

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán sốt rét bằng kỹ thuật xét nghiệm lam máu nhuộm Giemsa.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## **2. Kỹ thuật xét nghiệm chẩn đoán nhanh phát hiện sốt rét (Rapid diagnostic Test - RDTs)**

Kỹ thuật được áp dụng trong các trường hợp nơi không có kính hiển vi, thôn bản cách xa điếm kính hiển vi trên một giờ đi bộ, trường hợp các cán bộ không được đào tạo về kỹ thuật xét nghiệm KST SR trên kính hiển vi; và để chẩn đoán nhanh khi cần thiết. Kết quả xét nghiệm với xét nghiệm chẩn đoán nhanh xác định sốt rét chỉ có ý nghĩa với các test phát hiện kháng nguyên, không sử dụng xét nghiệm kháng thể để chẩn đoán mắc sốt rét. Kết quả xét nghiệm được trả lời sớm trong vòng 15 phút sau khi lấy mẫu. Có thể lặp lại xét nghiệm như giống với trường hợp xét nghiệm bằng kỹ thuật nhuộm giem sa, soi kính hiển vi. Ngưỡng phát hiện khoảng 50-100 KST/ $\mu$ l máu đầu ngón tay.

Kỹ thuật xét nghiệm có khuyến cáo của WHO; test thử là các bộ sinh phẩm đã được thương mại hóa trên thị trường có ngưỡng phát hiện, độ nhạy, độ đặc hiệu của hãng. Hóa chất sinh phẩm tùy theo từng hãng cung cấp trọn bộ trong bộ sinh phẩm.

### **2.1. Phạm vi áp dụng**

Phương pháp này áp dụng cho việc xét nghiệm ký sinh trùng sốt rét trong mẫu máu mao mạch, thu thập từ đầu ngón tay; hoặc máu tĩnh mạch bằng cách nhận diện kháng nguyên của ký sinh trùng sốt rét qua phản ứng miễn dịch kháng nguyên, kháng thể.

### **2.2. Nguyên lý**

Kháng thể đặc trưng của người với từng loài ký sinh trùng sốt rét được gắn lên các que thử có khả năng kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên – protein của ký sinh trùng sốt rét.

Nếu trong mẫu máu xét nghiệm có các loài ký sinh trùng đặc hiệu thì kháng nguyên sẽ kết hợp với kháng thể tạo ra các vạch dương tính có màu. Tùy theo từng hãng sản xuất khác nhau, có thể có các kháng thể tổng hợp khác nhau: trong trường hợp sinh phẩm chẩn đoán nhanh của hãng SD: SD Bioline Malaria Antigen P.f/P.v: các kháng thể tổng hợp sẽ phát hiện HRP-II (Histidine-rich Protein II) đặc hiệu với *P.falciparum* và pLDH (Plasmodium lactate dehydrogenase) đặc hiệu với *P. vivax* trong máu người.

### **2.3. An toàn sinh học**

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về an toàn sinh học theo quy định hiện hành.

### **2.4. Thực hiện xét nghiệm**

#### **2.4.1. Mẫu bệnh phẩm**

- Máu đầu ngón tay: lau bỏ giọt máu đầu, máu tĩnh mạch bảo quản trong chất chống đông

- Một xét nghiệm chẩn đoán nhanh cần: 5  $\mu$ l máu

- Máu nên được tiến hành xét nghiệm ngay sau khi lấy máu, hoặc bảo quản tối đa ở nhiệt độ 2-8°C trong 72 giờ.

- Nếu không xét nghiệm ngay thì mẫu thử phải để trong tủ lạnh 2-8°C và nếu quá 3 ngày mẫu thử phải được làm đông đá. Mẫu thử phải được để ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng. Các mẫu thử nghiệm đã cất giữ quá 3 ngày có thể có phản ứng không đặc hiệu.

#### 2.4.2. Dụng cụ, sinh phẩm, hóa chất

Tùy theo từng bộ sinh phẩm khác nhau có các dụng cụ và hóa chất khác nhau. Đối với bộ sinh phẩm SD Bioline Malaria Antigen P.f/P.v, một bộ sinh phẩm đóng gói 10 test thử cụ thể như sau:

- 01 túi kim chích máu: 10 kim
- 01 túi bông cồn: 10 túi nhôm có bông cồn
- 01 túi pi pét lấy mẫu: 10 pipette
- 10 túi nhôm đựng que thử: 01 que thử, 01 túi chống ẩm
- 01 lọ dung dịch đệm thử: 5 ml
- 01 bản hướng dẫn sử dụng

Không sử dụng bộ sinh phẩm xét nghiệm nếu túi nhôm đựng bị rách, hỏng, hoặc chỗ hàn bị hở.

Để bộ sinh phẩm ở nơi không bị các loài côn trùng, sâu bọ, mối mọt, chuột hoặc súc vật nuôi phá hủy.

Khi vận chuyển hoặc bảo quản tránh tiếp xúc với nhiệt độ cao ( $\geq 45^{\circ}\text{C}$ ) quá 1 tuần.

Mỗi que thử chỉ sử dụng cho một người.

Không trộn lẫn các thuốc thử của các lô khác nhau.

Không để que thử tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời, hơi nóng.

Không để que thử gần tường, trần nhà hoặc nơi ẩm ướt như nền nhà.

#### 2.4.3. Các bước tiến hành

Mẫu là máu đầu ngón tay:

**Bước 1. Ghi nhận thông tin** của bệnh nhân vào phiếu xét nghiệm, đi găng tay



**Hình 15: Đi găng tay**

**Bước 2 chích máu:** Lau sạch ngón tay người được lấy mẫu bằng bông cồn, đợi cồn khô rồi chích máu:



**Hình 16: Làm sạch đầu ngón tay**



Dùng kim chích, chích vào đầu ngón tay vừa sát trùng



**Hình 17: Trích máu đầu ngón tay**

**Bước 3 lấy máu:**

- Đối với máu đầu ngón tay: Dùng pipét lấy mẫu nhúng đầu tròn vào giọt máu, để máu hút lên đến vạch định mức 5 $\mu$ l.

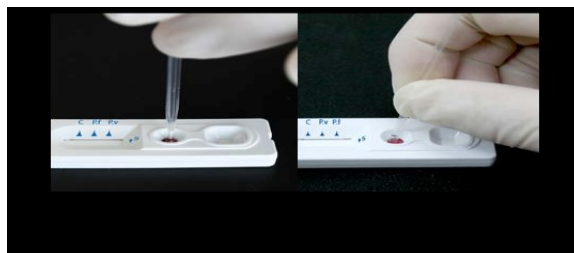
- Với máu toàn phần trong ống chống đông: Lấy máu ở tủ bảo quản ra, để khoảng 15 phút cho đến khi mẫu máu đạt nhiệt độ phòng. Dùng pipét lấy mẫu nhúng đầu tròn vào ống mẫu, để máu hút lên đến vạch định mức 5 $\mu$ l



**Hình 18: Thu máu đầu ngón tay**

**Bước 4 xét nghiệm:**

Đề đầu tròn của pipét vào giếng mẫu hình tròn – có ký hiệu chữ “S” rồi ấn nhẹ



**Hình 19: Ấn nhẹ đầu pipét vào giếng**

Nhỏ 4 giọt dung môi vào giếng dung môi hình vuông



**Hình 20: Nhỏ dung môi**

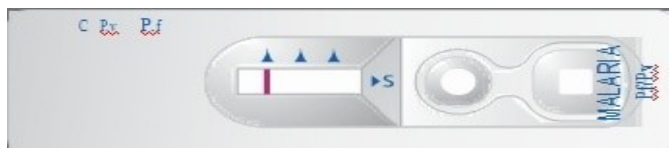
Kết quả sau 15 phút tới 30 phút, không đọc kết quả sau 30 phút.

## 2.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

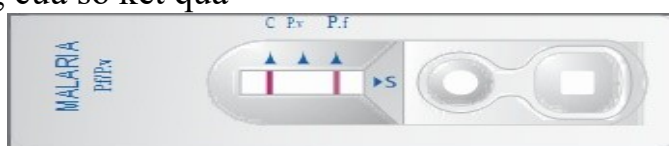
### 2.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

Không xuất hiện vạch tại vị trí “C” trong cửa sổ kết quả: que thử bị hỏng, không ghi nhận kết quả. Chỉ ghi nhận kết quả khi que thử có ít nhất 1 vạch đỏ tại vị trí “C”, lúc đó kết quả được ghi nhận như sau:

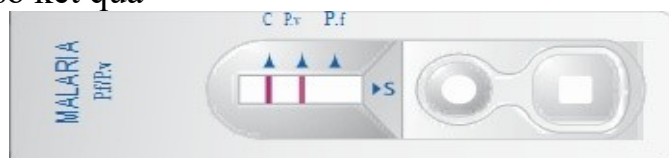
- Mẫu âm tính: que thử chỉ có 1 vạch màu đỏ tại vị trí “C” trong cửa sổ kết quả



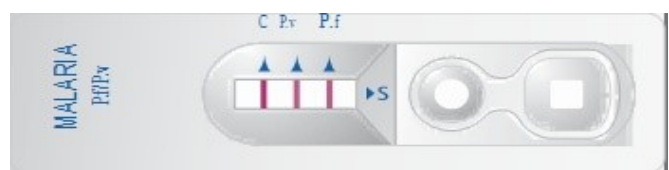
- Mẫu dương tính với *P.faci-parum*: que thử có 2 vạch màu đỏ tại vị trí “P.f” và “C” trong cửa sổ kết quả



- Mẫu dương tính với *P.vivax*: que thử có 2 vạch màu đỏ tại vị trí “P.v” và “C” trong cửa sổ kết quả



- Mẫu dương tính nhiễm phối hợp *P.faci-parum* và *P.vivax*: que thử có 3 vạch màu đỏ tại vị trí “P.v”; “P.f” và “C” trong cửa sổ kết quả



### 2.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Nếu quá trình xét nghiệm tiến hành theo đúng hướng dẫn:

+ Kết quả xét nghiệm có vạch “C” ghi nhận kết quả xét nghiệm như mục 2.5.

+ Kết quả xét nghiệm không có vạch “C” không ghi nhận kết quả xét nghiệm.

+ Kết quả xét nghiệm có vạch “C”, nhưng mờ, tiến hành thử nghiệm thêm 01 que thử nữa – nếu vẫn có vạch “C” mờ thì vẫn ghi nhận kết quả - nhưng cần ghi lưu ý vào biểu mẫu ghi nhận kết quả

+ Trường hợp 1 bộ sinh phẩm đóng gói 10 que thử có từ 2 que thử hỏng (xét nghiệm không có vạch “C”) thì loại bỏ cả bộ sinh phẩm đó.

- Nếu những bộ sinh phẩm ở thực địa bị hỏng trước thời hạn sử dụng, có thể gửi các bộ sinh phẩm về đơn vị phân phối để đánh giá song song với các bộ sinh phẩm cùng lô sản xuất còn lưu tại PTN.

### **2.5.3. Ghi chép và báo cáo kết quả xét nghiệm**

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán sốt rét bằng kỹ thuật xét nghiệm test nhanh.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## **3. Phương pháp xét nghiệm xác định 4 loài ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* gây bệnh cho người trên mẫu máu bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymerase đa môi bán lồng (Seminested Multiplex PCR)**

### **3.1. Phạm vi áp dụng**

Phương pháp này áp dụng cho việc xét nghiệm ký sinh trùng sốt rét trong mẫu máu mao mạch, thu thập từ đầu ngón tay; máu tĩnh mạch được bảo quản khô trên giấy thấm hoặc mẫu máu tươi không chống đông hoặc chống đông với EDTA bằng cách nhận diện gen đặc trưng của ký sinh trùng sốt rét qua phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase.

### **3.2. Nguyên lý**

Phương pháp này nhân bản ADN đích (18s ribosome) đặc trưng cho từng loài KSTSR gây bệnh trên người.

Quá trình được thực hiện bằng cách tiến hành 2 lần phản ứng PCR với các cặp mồi khác nhau: phản ứng PCR lần một nhân bản đoạn gen cho ký sinh trùng sốt rét nói chung *Plasmodium spp.* và chứng dương nội kiểm là đoạn gen của người. Phản ứng PCR lần hai khuếch đại đoạn gen đặc trưng cho từng loài ký sinh trùng sốt rét *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale*. Điện di sản phẩm nhân bản trên gel agarose, nhuộm màu ADN bằng Ethidium Bromide và quan sát dưới đèn cực tím (UV). Nếu trong mẫu có gen đích đặc trưng cho từng loài ký sinh trùng, trên bảng gel điện di sẽ xuất hiện sản phẩm nhân bản có kích thước phù hợp với độ dài của đoạn ADN đích đã định. Nếu trong mẫu không có gen đích, trên gel điện di không xuất hiện sản phẩm nhân bản hay sản phẩm nhân bản có kích thước không phù hợp với đoạn ADN đích.

### **3.3. An toàn sinh học**

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về an toàn sinh học theo quy định hiện hành đối với Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp II.

Thuốc nhuộm ethidium bromide là một chất độc có thể gây ung thư cho người và động vật. Do đó, khi sử dụng hóa chất này phải mang găng tay và kính bảo hộ. Dung dịch sau khi sử dụng phải cho chảy qua than hoạt tính trước khi đổ bỏ hoặc có biện pháp xử lý chuyên biệt khác.

Tham khảo các thuốc nhuộm khác an toàn như Sybr Green, GelRed, v.v.

### 3.4. Thực hiện xét nghiệm

#### 3.4.1. Mẫu bệnh phẩm

##### a. Loại mẫu

Mẫu máu khô được lưu giữ trên giấy thấm Whatman 3 MM: 01 giọt máu có đường kính 1,5 cm (tương đương khoảng 100  $\mu$ L).

Mẫu máu toàn phần trong ống chống đông (EDTA) hoặc không chống đông: 50  $\mu$ L.

Mẫu xét nghiệm ngay. Khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, xét nghiệm trong vòng 3 ngày. Mẫu máu được bảo quản ở nhiệt độ -20°C có thể được xét nghiệm trong vòng 1 năm. Mẫu máu được bảo quản ở nhiệt độ -70°C có thể được xét nghiệm trong vòng 3 năm.

##### b. Tách chiết ADN

###### ***Chuẩn bị đệm tách chiết ADN bằng QIAamp DNA Micro Kit:***

- QIAamp DNA Micro Kit
- Ethanol (96-100%)

###### **Tiến hành:**

- Đệm AVL:

+ Kiểm tra đệm ATL, đảm bảo dung dịch đệm đồng nhất.

- Đệm AW1:

+ Bổ sung Ethanol (96-100%) vào chai đệm AW1 theo hướng dẫn của kit tách chiết.

+ Đánh dấu trên nắp chai đã thêm ethanol và ghi ngày tháng năm chuẩn bị đệm AW1 trên chai.

+ Bảo quản ở nhiệt độ phòng theo hạn sử dụng của kit tách chiết.

- Đệm AW2

+ Bổ sung Ethanol 96 - 100% vào chai AW2 theo hướng dẫn của kit tách chiết.

+ Đánh dấu trên nắp chai đã thêm ethanol và ghi ngày, tháng, năm chuẩn bị đệm AW2 trên chai.

+ Bảo quản ở nhiệt độ phòng theo hạn sử dụng của kit tách chiết.

###### ***Chuẩn bị hóa chất tách chiết ADN bằng chelex:***

- Các hóa chất này được bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh thường nhiệt độ từ 4°C đến 8°C

- Nước cất hai lần

- Chelex 100 (Chelex 100 sodium form, 50-100 mesh dry, pH: 4-14)

- Saponin: dạng muối khan dùng cho sinh học phân tử

- Dung dịch PBS 1X: pH = 7,2  $\pm$  0,2.

###### **Tiến hành:**

- Chelex 10%: Pha dạng dung dịch 10% bằng cách cân 10 gam Chelex-100 hạt pha trong 100 ml dung dịch nước khử ion bảo quản ở nhiệt độ  $\leq$  20°C trong vòng 3 tháng.

- Saponin 0,5%: cân 5g Saponin hòa tan trong 1000 ml dung dịch PBS 1X bảo quản ở 4°C đến 8°C trong vòng 2 tuần.

- PBS 1X: Có thể mua dạng PBS bán sẵn trên thị trường dạng bột, nước hoặc viên và sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc pha PBS theo hướng dẫn sau:

+ Pha PBS 10X: Cân chính xác lượng hóa chất theo bảng dưới tùy theo số lượng dung dịch cần pha:

**Bảng 3: Pha hóa chất PBS**

Tên hoá chất	Pha 1 lít	Pha 2 lít	Pha 4 lít
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,96g	23,92g	47,84g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,56g	5,12g	10,24g
NaCl	87,66g	175,32g	350,64g

+ Cho 500ml nước cất hai lần, trộn đều trên máy khuấy từ, chỉnh PH 7,2 bằng HCl (1N) hoặc NaOH (1N) sau đó cho thêm nước vừa đủ đến 1000 ml. Bảo quản ở 4°C trong vòng 1 tháng.

+ Pha PBS 1X:

Dùng ống đong lấy 100 ml dung dịch đậm PBS 10X vào định mức 1000ml (bình cổ cò 1000ml).

Thêm nước cất.

Bảo quản ở 4°C trong vòng 1 tuần.

***Chuẩn bị và xử lý mẫu***

- Lấy mẫu từ nơi bảo quản (mẫu cần phân tích, mẫu chứng)
- Ghi ký hiệu mẫu vào nắp ống nhựa 1,5ml
- Với mẫu máu khô từ giấy thấm
- Xử lý kim bấm bằng dung dịch Javel 0,5%, rửa lại 2 lần bằng nước cất, rửa lần cuối bằng cồn tuyệt đối, làm khô bằng cách bấm giấy thấm cứng 10 lần.

- Dùng kim bấm 3 lỗ có đường kính 5mm trên giọt máu khô vào ống 1,5 ml đã ghi ký hiệu mẫu.

- Xử lý kim bấm bằng dung dịch Javen 0,5%, rửa lại 2 lần bằng nước cất, rửa lần cuối bằng cồn tuyệt đối, làm khô bằng cách bấm giấy thấm cứng 10 lần.

- Với mẫu là mẫu máu tươi thì cho vào mỗi ống 50 µl máu toàn phần Cứ 11 mẫu máu phân tích, thì bổ xung 1 mẫu chứng âm tách chiết. Khi mẫu phân tích nhỏ hơn 11, thì mỗi lần phân tích đều phải có mẫu chứng âm tách chiết.

***Tách chiết ADN:***

Sử dụng chứng âm tách chiết: Mẫu giấy thấm Whatman 3MM sạch (đã tiệt trùng) được cắt cùng với mẫu trong quá trình tách AND và chứng dương nội tại: ADN người của mẫu phân tích.

- Sử dụng dung dịch 10% chelex-100

- + Cho 1000µl saponin 0.5% vào tuýp Eppendoft 1,5 ml chứa mẫu

- + Ủ ở 56°C trong 30 phút trên máy lắc ủ nhiệt khô với tốc độ lắc 900 vòng/phút

- + Ly tâm ở 12000/phút trong 5 phút, hút bỏ dịch nổi
- + Cho 1000 µl PBS vào tuýp mẫu, trộn mẫu bằng máy trộn vortex trong 10 giây với tốc độ lắc 900 vòng/phút. Ly tâm ở 12000/phút trong 5 phút, hút bỏ dịch nổi (lặp lại 3 lần).
- + Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 3 phút, hút sạch dịch nổi.
- + Cho 150µl Chelex -100 10%, đặt trong máy lắc ủ nhiệt khô ở 100°C trong 10 phút với tốc độ lắc 900 vòng/phút
- + Ly tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút
- + Thu hết dịch nổi có chứa ADN vào tuýp 1,5ml sạch đã ghi ký hiệu mẫu và ngày và lô tách chiết.
- + Bảo quản ADN trong tủ lạnh sâu < - 20 °C cho đến khi sử dụng
- Sử dụng bộ sinh phẩm QIAamp DNA Micro Kit
- + Thêm 180 µl dung dịch đệm nghiền mẫu ATL vào ống 1,5 ml đã có mẫu.
- + Thêm vào 20 µl Proteinase K, trộn đều và ly tâm nhanh.
- + Đặt ống ủ ở nhiệt độ 56°C/ 900 vòng/phút trong 1 giờ.
- + Ly tâm nhanh.
- + Thêm vào 200 µl dung dịch đệm ly giải AL, trộn đều trong vòng 10 giây.
- + Đặt ống ủ ở nhiệt độ 70°C/ 900 vòng/phút trong 10 phút.
- + Ly tâm nhanh.
- + Chuyển dịch nổi vào cột, ly tâm tốc độ 8000 vòng/phút, chuyển cột sang 01 ống 2 ml mới.
- + Thêm vào 500 µl dung dịch đệm rửa 1 AW1, ly tâm tốc độ 8000 vòng/phút, chuyển cột sang 01 ống 2 ml mới.
- + Thêm vào 500 µl dung dịch đệm rửa AW2, ly tâm tốc độ 8000 vòng/phút, chuyển cột sang 01 ống 2 ml mới.
- + Ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút/3 phút.
- + Đặt cột vào trong ống 1,5 ml, Thêm vào 50 µl dung dịch đệm hòa tan AE.
- + Đậy nắp tuýp, để ở nhiệt độ phòng 5 phút, ly tâm 14.000 vòng/phút/2 phút thu ống ADN.
- + Bảo quản ADN ở -20°C.

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

#### **a. Chứng và mẫu**

- Mẫu xét nghiệm là ADN được tách chiết từ phần trên
- Chứng dương là ADN của KST SR: *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale*
- Chứng âm là:
- + Chứng âm tách chiết
- + Chứng trắng cho phản ứng PCR lần 1: nước cất được thêm vào ống đối chứng khi nạp mẫu phản ứng PCR lần 1.

+ Chứng trắng cho phản ứng PCR lần 2: nước cất được thêm vào ống đối chứng khi nạp mẫu phản ứng PCR lần 2.

**b. Hóa chất, sinh phẩm vật tư tiêu hao dùng cho phản ứng PCR**

- Nước cất khử ion.
- Đệm PCR 10X
- dNTPs nồng độ 2 mM
- Môi UNR nồng độ 25  $\mu$ M
- Môi PLF nồng độ 25  $\mu$ M
- Môi HUF nồng độ 1,5  $\mu$ M
- Môi FAR nồng độ 15  $\mu$ M đến vạch định mức, đầy nắp bình, trộn đều dung dịch.

- Môi VIR nồng độ 2,5  $\mu$ M
- Môi OVR nồng độ 6,25  $\mu$ M
- Môi MAR nồng độ 3,12  $\mu$ M
- Hot starTaq DNA polymerase (5 đơn vị/1 $\mu$ l)

**c. Môi cho PCR bán lỏng**

**Bảng 4: Trình tự môi của phản ứng PCR đa môi bán lỏng**

Môi	Tên môi	Trình tự môi
Môi ngược chung	UNR	GAC GGT ATC TGA TCG TCT TC
Môi xuôi giống Plasmodium	PLF	AGT GTG TAT CAA TCG AGT TTC
Môi xuôi người	HUF	GAGCCGCCTGGATACCGC
Môi xuôi <i>P.falciparum</i>	FAR	AGT TCC CCT AGA ATA GTT ACA
Môi xuôi <i>P.malariae</i>	MAR	GCC CTC CAA TTG CCT TCT G
Môi xuôi <i>P.ovale</i>	OVR	GCA TAA GGA ATG CAA AGA ACA G
Môi xuôi <i>P.vivax</i>	VIR	AGG ACT TCC AAG CCG AAG C

**3.4.3. Tiến hành thực hiện phản ứng PCR lần 1**

**a. Chuẩn bị hỗn hợp dung dịch PCR lần 1:** Thực hiện tại phòng chuẩn bị phản ứng PCR.

- Lấy hóa chất từ tủ -20°C ra, để tan đá ở nhiệt độ phòng (ngoại trừ Taq DNA polymerase). Trộn đều các ống hóa chất bằng máy vortex 10 giây ở tốc độ 900 vòng/phút và ly tâm nhanh ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 15 giây.

- Chuẩn bị và ghi ký hiệu mẫu lên ống PCR theo danh sách mẫu phân tích, mẫu chứng dương và chứng âm theo biểu mẫu

- Trộn thành phần phản ứng PCR trong ống 1,5 ml theo bảng sau

**Bảng 5. Pha dung dịch phản ứng PCR lần 1- PCR đa môi bán lồng**

Hóa chất cho PCR 1	Thể tích (μl)	Thể tích cho N phản ứng (μl)
Nước cất khử ion	29,8	29,8 x (n+1)
Đệm PCR 10X (MgCl <sub>2</sub> 15mM)	5	5 x (n+1)
dNTPs (2mM)	2	2 x (n+1)
Môi ngược UNR(25 μM)	1	1 x (n+1)
Môi xuôi PLF(25 μM)	1	1 x (n+1)
Môi xuôi HUF(1,5 μM)	1	1 x (n+1)
Hot star Taq DNA polymerase (5 đơn vị/μl)	0,2	0,2 x (n+1)

- Cất các hóa chất vào tủ lạnh ở điều kiện -20°C

- Trộn đều hỗn hợp dung dịch PCR bằng máy vortex 10 giây ở tốc độ 900 vòng/phút và ly tâm nhanh ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 giây.

- Chia đều hỗn hợp cho các ống phản ứng với thể tích 40 μl.

**b. Nạp mẫu:** Thực hiện tại phòng tách chiết và nạp mẫu

- Lấy các ống mẫu ADN trong tủ lạnh -20°C ra, để tan đá ở nhiệt độ phòng, ly tâm nhanh ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 giây.

- Lấy 10μl dung dịch ADN khuôn cho vào ống hỗn hợp phản ứng theo đúng ký hiệu mẫu từ biểu mẫu

- Lấy 10μl nước cất khử ion vào ống chứng trắng.

- Lấy 10μl ADN chứng dương của 4 loài ký sinh trùng sốt rét cho vào các ống chứng dương tương ứng.

- Cất mẫu ADN khuôn còn lại vào tủ lạnh sâu <-20°C.

**Chú ý:** cứ 11 xét nghiệm thì có 1 mẫu chứng âm tách chiết, mỗi lần tiến hành PCR đều bắt buộc có chứng trắng và chứng dương. Trình tự các mẫu sắp xếp như sau: mẫu xét nghiệm, mẫu chứng âm tách chiết, mẫu chứng trắng, mẫu chứng dương.

**c. Các bước tiến hành phản ứng PCR:** Thực hiện tại phòng máy PCR

Đặt chương trình phản ứng PCR lần 1 như sau:

**Bảng 6. Chương trình phản ứng PCR lần 1 – PCR đa môi bán lồng**

Số bước	Chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	Biến tính ADN	95	5 phút	1
2	Biến tính ADN	94	1 phút	}40
3	Bắt cặp môi	60	1 phút	
4	Tổng hợp ADN	72	1 phút 30 giây	
5	Tổng hợp lần cuối	72	10 phút	1

Sau đó giữ ở nhiệt độ 15°C cho đến khi lấy ra khỏi máy



- Đặt các ống mẫu vào máy PCR, đậy nắp và chạy máy theo chương trình đã thiết lập.

- Sau khi chu trình chạy kết thúc, lấy mẫu ra khỏi máy, tắt máy.

- Cát mẫu ở ngăn mát của tủ lạnh.

### 3.4.4. Tiến hành thực hiện phản ứng PCR lần 2

#### a. Chuẩn bị hỗn hợp dung dịch phản ứng PCR lần 2:

Tương tự như lần 1, thành phần phản ứng PCR trong ống 1,5 ml theo bảng sau

**Bảng 7. Pha dung dịch phản ứng PCR lần 2 - PCR đa môi bán lồng**

Hóa chất cho PCR 2	Thể tích ( $\mu$ l)	Thể tích cho N phản ứng ( $\mu$ l)
1. Nước cất khử ion	14,3	14,3 x (n+1)
2. Đệm PCR 10X ( $MgCl_2$ 15mM)	2,5	2,5 x (n+1)
3. dNTPs 2 mM	1	1 x (n+1)
4. Môi xuôi PLF 25 $\mu$ M	1	1 x (n+1)
5. Môi ngược FAR 15 $\mu$ M	1	1 x (n+1)
6. Môi ngược VIR 2,5 $\mu$ M	1	1 x (n+1)
7. Môi ngược MAR 3,12 $\mu$ M	1	1 x (n+1)
8. Môi ngược OVR 6,25 $\mu$ M	1	1 x (n+1)
6. Hot star Taq DNA polymerase (5 đơn vị/ $\mu$ l)	0,2	0,2 x (n+1)

- Trộn đều hỗn hợp dung dịch PCR bằng máy vortex 10 giây trong 900 vòng/phút và ly tâm nhanh ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 giây.

- Chia đều hỗn hợp cho các tuýp phản ứng với thể tích 23  $\mu$ l

#### b. Pha loãng sản phẩm PCR lần 1 – thực hiện tại phòng PCR lồng

- Chuyển sản phẩm PCR lần 1 vào phòng PCR lồng.

- Ly tâm sản phẩm PCR lần 1 ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 giây

- Ghi ký hiệu mẫu lên ống 1,5 ml theo danh sách mẫu phân tích mẫu

- Lấy 499  $\mu$ l nước cất khử ion vào mỗi ống 1,5 ml đã ghi ký hiệu mẫu

- Lấy 1  $\mu$ l sản phẩm PCR lần 1 cho vào các ống nước trên theo ký hiệu mẫu tương ứng.

- Trộn dung dịch đã pha loãng bằng máy vortex 10 giây trong 900 vòng/phút và ly tâm nhanh ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 giây

#### c. Nạp mẫu:

- Lấy 2  $\mu$ l dung dịch ADN khuôn đã được pha loãng cho vào ống PCR theo đúng ký hiệu mẫu.

- Lấy 2  $\mu$ l nước cất khử ion cho vào ống chứng trắng.

- Cát mẫu PCR lần 1 vào tủ lạnh sâu  $< -20^{\circ}C$

- Bỏ mẫu pha loãng.

**d. Các bước tiến hành phản ứng PCR:** Thực hiện tại phòng máy PCR

- Đặt chương trình phản ứng PCR lần 2 như sau

**Bảng 8. Chương trình phản ứng PCR lần 2 - PCR đa môi bán lồng**

Số bước	Chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	Biến tính ADN	95	5 phút	1
2	Biến tính ADN	94	30 giây	} 25
3	Bắt cặp môi	62	30 giây	
4	Tổng hợp ADN	72	1 phút	
5	Tổng hợp lần cuối	72	10 phút	1
Sau đó giữ ở nhiệt độ 15°C cho đến khi lấy ra khỏi máy				

- Đặt các ống mẫu vào máy PCR, đậy nắp và chạy máy theo chương trình đã thiết lập.

- Sau khi chu trình chạy kết thúc, lấy mẫu ra khỏi máy, tắt máy.

- Chuyển mẫu sang phòng phân tích mẫu và cất mẫu ở ngăn mát của tủ lạnh thường.

### 3.4.5 Điện di

#### a) Hóa chất dùng cho điện di sản phẩm PCR:

- Agarose
- Dung dịch TBE 10X
- Ethidium Bromide 10mg/ml
- Thang chuẩn ADN 100 bp
- Dung dịch Loading Buffer

#### b) Tiến hành

Điện di trên gel agarose nồng độ 2% với dung dịch đệm TBE 0,5X cụ thể như sau:

#### Chuẩn bị gel

- *Pha dung dịch đệm TBE 0,5X*: pha dung dịch sử dụng 0,5X (50 ml TBE 10X + 950 ml nước cất hai lần)

- *Chuẩn bị gel agarose*: tùy theo từng loại khay đổ gel mà tính toán lượng agarose và lượng TBE 0,5X phù hợp.

+ Cân lượng agarose cho vào trong lọ thủy tinh.

+ Đong lượng TBE 0,5 X phù hợp vào lọ thủy tinh.

+ Lắc đều, để agarose trộn đều.

+ Đậy nắp lọ (chú ý không vặn chặt), hoặc bọc miệng lọ bằng màng bọc chịu nhiệt có chọc lỗ nhỏ.

+ Đun dung dịch trong lò vi sóng, chú ý điều chỉnh nhiệt độ và thời gian phù hợp quan sát agarose sôi đều, tan hết và trong suốt là có thể lấy ra được.

+ Làm lạnh dung dịch agarose dưới vòi nước chảy bằng cách xoay nhẹ, hoặc để nguội ở nhiệt độ phòng tới khoảng 60°C.

+ Đổ dung dịch agarose vào khay với độ dày 5 mm.

+ Để agarose đông và nguội ít nhất sau 1 giờ mới tiến hành chạy điện di, không chuyển vị trí khay gel.

### **Điện di**

- Chuyển bản gel vào khay chạy điện di.
- Đồ dung dịch TBE 0,5 X ngập bản gel
- Nạp mẫu vào các giếng gel, mỗi giếng 5  $\mu$ l sản phẩm PCR, trước khi nạp chứng dương thì nạp thang chuẩn ADN loại 100bp.
- Nếu số lượng mẫu nhiều thì cứ khoảng 12 mẫu có một thang chuẩn ADN.
- Đảm bảo mỗi bản gel khi chạy đều có các mẫu chứng dương và chứng âm, chứng trắng.
- Chạy điện di với điện áp 110V trong thời gian 90 phút.
- Nhuộm gel: Sau khi điện di xong, lấy gel ra khỏi máy và nhuộm trong dung dịch Ethidium bromide nồng độ 25  $\mu$ g/ml trong thời gian 30 phút.
- Chụp ảnh : Sản phẩm PCR được đọc dưới ánh sáng đèn tử ngoại (tia UV) và được chụp ảnh bằng hệ thống chụp ảnh gel kỹ thuật số

### **3.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm**

#### **3.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm**

Kết quả của quy trình là các sản phẩm nhân bản ADN biểu thị bằng các băng sáng dưới đèn tử ngoại.

Trong trường hợp các chứng âm tách chiết, chứng trắng không tạo ra các băng sáng dưới ánh đèn tử ngoại.

Các chứng dương có kết quả:

Chứng dương *P.falciparum* : 395 bp.

Chứng dương *P.vivax*: 499 bp

Chứng dương *P. malaria*: 269 bp

Chứng dương *P.ovale*: 436 bp

Kết quả xét nghiệm được ghi nhận như sau:

- Âm tính: cột chạy không hiện băng.

- Dương tính: với từng loài KST SR các băng điện di có kích thước tương ứng với các chứng dương ở trên

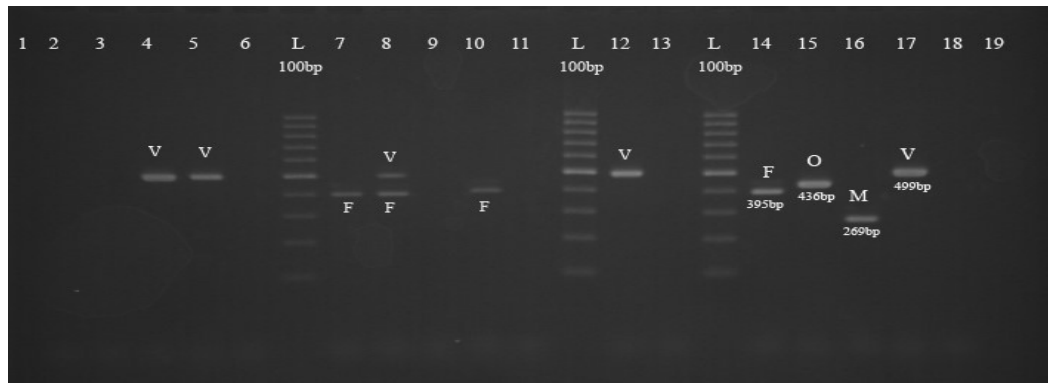
*P.falciparum* : 395 bp.

*P.vivax*: 499 bp

*P. malaria*: 269 bp

*P.ovale*: 436 bp

Trường hợp nhiễm phối hợp 1 mẫu có thể có từ 2-4 vạch, có kích thước tương ứng như trên.



**Hình 21. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR phân biệt KST sốt rét**

Trong trường hợp chứng âm, chứng dương không đúng thì không ghi nhận kết quả xét nghiệm. Kiểm tra lại toàn bộ quá trình xét nghiệm để quyết định tiến hành lại xét nghiệm từ bước nào.

### 3.5.2. Nhận định kết quả

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

Kết quả của phương pháp PCR đa môi bán lồng không cho kết quả rõ ràng hoặc trong trường hợp cần khẳng định chính xác kết quả, phòng xét nghiệm có thể yêu cầu lấy lại bệnh phẩm và xét nghiệm theo thường quy của phòng từ bước nhận bệnh phẩm hoặc phòng xét nghiệm sẽ xét nghiệm bằng phương pháp Realtime PCR và ngược lại.

### 3.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán sốt rét bằng kỹ thuật xét nghiệm PCR đa môi bán lồng.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PNX.

## 4. Phương pháp xác định 4 loài ký sinh trùng sốt rét *P.falciparum*, *P.vivax*, *P. malariae*, *P.ovale* gây bệnh trên người bằng kỹ thuật PCR lồng (Nested PCR)

Được áp dụng trong các trường hợp nghi ngờ sốt rét, xác định bằng các kỹ thuật trên không phát hiện thấy ký sinh trùng sốt rét; những trường hợp soi lam nghi ngờ KSTSR có hình thể lạ, không điển hình, trường hợp các đang tiến hành loại trừ sốt rét, hoặc vùng nghi ngờ sốt rét quay trở lại thì có thể lấy thêm mẫu để làm xét nghiệm PCR khẳng định kết quả của các xét nghiệm trên. Đặc biệt có hiệu quả trong việc phát hiện ký sinh trùng lạnh và người mang KST không triệu chứng, tầm soát nguồn lây truyền bệnh. Kết quả xét nghiệm muộn trong vòng 2 giờ đến 2 ngày. Có thể lặp lại xét nghiệm như giống với trường hợp xét nghiệm bằng kỹ thuật nhuộm giếm sa, soi kính hiển vi. Ngưỡng phát hiện khoảng 0,5-5 KST/ $\mu$ l máu đầu ngón tay.

Kỹ thuật được khuyến cáo sử dụng để khẳng định kết quả loại trừ sốt rét, xét nghiệm ca bệnh ở những vùng kiểm soát sốt rét quay trở lại.

#### **4.1. Phạm vi áp dụng**

Phương pháp này áp dụng cho việc xét nghiệm ký sinh trùng sốt rét trong mẫu máu mao mạch, thu thập từ đầu ngón tay; hoặc máu tĩnh mạch được bảo quản khô trên giấy thấm hoặc mẫu máu tươi không chống đông hoặc chống đông với EDTA bằng cách nhận diện gen đặc trưng của ký sinh trùng sốt rét qua phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase lồng (nested PCR).

#### **4.2. Nguyên lý**

Phương pháp này nhân bản ADN đích (18s ribosome) đặc trưng cho từng loài KSTSR gây bệnh trên người.

Quá trình được thực hiện bằng cách tiến hành 2 lần phản ứng PCR với các cặp mồi khác nhau: phản ứng PCR lần một nhân bản đoạn gen cho ký sinh trùng sốt rét nói chung *Plasmodium spp.* Bốn phản ứng PCR lần hai khuếch đại đoạn gen đặc trưng cho từng loài ký sinh trùng sốt rét *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale*. Điện di sản phẩm nhân bản trên gel agarose, nhuộm màu ADN bằng Ethidium Bromide và quan sát dưới đèn cực tím (UV). Nếu trong mẫu có gen đích đặc trưng cho từng loài ký sinh trùng, trên bảng gel điện di sẽ xuất hiện sản phẩm nhân bản có kích thước phù hợp với độ dài của đoạn ADN đích đã định. Nếu trong mẫu không có gen đích, trên gel điện di không xuất hiện sản phẩm nhân bản hay sản phẩm nhân bản có kích thước không phù hợp với đoạn ADN đích.

#### **4.3. An toàn sinh học**

Tham khảo mục 3.3, phần III, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh sốt rét.

#### **4.4. Thực hiện xét nghiệm**

##### **4.4.1. Mẫu bệnh phẩm**

Thực hiện theo hướng dẫn mô tả trong Mục 3.4.1, Phần III, bệnh này.

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

###### **a. Chuẩn bị chứng và mẫu**

- Mẫu xét nghiệm là ADN được tách chiết từ phần trên
- Chứng dương là ADN của KST SR: *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale*

- Chứng âm là:

- + Chứng âm tách chiết
- + Chứng trắng cho phản ứng PCR lần 1: nước cất được thêm vào ống đối chứng khi nạp mẫu phản ứng PCR lần 1.
- + Chứng trắng cho phản ứng PCR lần 2: nước cất được thêm vào ống đối chứng khi nạp mẫu phản ứng PCR lần 2.

###### **b. Sinh phẩm hóa chất dùng cho phản ứng PCR**

Các hóa chất sử dụng cho quá trình xét nghiệm tương tự như đối với phản ứng PCR đa mồi bán lồng có một số điểm khác biệt như sau:

- Cặp mồi cho PCR lần 1: PLU5, PLU6 pha với nồng độ 1,25  $\mu\text{M}$ ;
- Các mồi xuôi, mồi ngược cho PCR lần 2: FAL1, FAL2, VIV1, VIV2, MAL1, MAL2, OVA1, OVA2 pha với nồng độ 1,25  $\mu\text{M}$ ;

### c. Môi dùng trong phản ứng

**Bảng 9: Trình tự môi của phản ứng PCR lồng**

Môi	Tên môi	Trình tự môi
Xác định giống <i>Plasmodium</i>	PLU5	5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3'
	PLU6	5'-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3'
<i>P. falciparum</i>	FAL1	5'- TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT -3'
	FAL2	5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'
<i>P. vivax</i>	VIV1	5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3'
	VIV2	5'-ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3'
<i>P. malariae</i>	MAL1	5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3'
	MAL2	5'-AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA-3'
<i>P. ovale</i>	OVA1	5'-ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA-3'
	OVA2	5'-GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG-3'

#### 4.4.3 Tiến hành thực hiện phản ứng PCR lần 1

**a. Chuẩn bị hỗn hợp dung dịch PCR lần 1:** Thực hiện tại phòng chuẩn bị phản ứng PCR

- Lấy hóa chất từ tủ -20°C ra, để tan đá ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút (ngoại trừ Taq DNA polymerase). Trộn đều các ống hóa chất bằng máy lắc vortex trong 10 giây ở tốc độ 900 vòng/phút và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 giây;

- Ghi ký hiệu mẫu lên ống PCR 0,2 ml theo danh sách mẫu phân tích, mẫu chứng dương và chứng âm;

- Trộn thành phần phản ứng PCR trong ống 1,5 ml với các thành phần sau:

**Bảng 10. Pha dung dịch phản ứng PCR lần 1 – PCR lồng**

Hóa chất cho PCR lần 1	Thể tích ( $\mu\text{l}$ )	Thể tích cho N phản ứng ( $\mu\text{l}$ )
Nước cất khử ion	11,8	11,8 x (n+1)
Đệm PCR 10X ( $\text{MgCl}_2$ 15 mM)	2,5	2,5 x (n+1)
dNTPs (2 mM)	2,5	2,5 x (n+1)
Môi PLU5 (1,25 $\mu\text{M}$ )	2,5	2,5 x (n+1)
Môi PLU6 (1,25 $\mu\text{M}$ )	2,5	2,5 x (n+1)
Taq DNA polymerase (5 đơn vị/ $\mu\text{l}$ )	0,2	0,2 x (n+1)
Tổng	22	22 x (n+1)

+ Cất các hóa chất vào tủ âm ở điều kiện  $< -20^\circ\text{C}$ ;

+ Trộn đều hỗn hợp dung dịch PCR bằng máy lắc vortex trong 10 giây ở tốc độ 900 vòng/phút và ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 15 giây; Chia đều hỗn hợp cho các ống phản ứng với thể tích 22  $\mu\text{l}$ /phản ứng.

**b. Nạp mẫu:** Thực hiện tại phòng tách chiết và nạp mẫu

- Lấy các ống mẫu ADN trong tủ âm  $< -20^\circ\text{C}$  ra, để tan đá ở nhiệt độ phòng, ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 15 giây;

- Lấy 3  $\mu\text{l}$  dung dịch ADN khuôn cho vào ống hỗn hợp phản ứng theo đúng ký hiệu mẫu;

- Lấy 3  $\mu\text{l}$  nước cất 2 lần khử ion vào ống chứng trắng;

- Lấy 3  $\mu\text{l}$  ADN chứng dương của 4 loài ký sinh trùng sốt rét cho vào các ống chứng dương tương ứng;

- Cất mẫu ADN khuôn còn lại vào tủ âm  $< -20^\circ\text{C}$ .

**c. Chạy phản ứng PCR trên máy luân nhiệt:** thực hiện tại phòng máy PCR.

- Đặt chương trình phản ứng PCR lần 1 như sau:

**Bảng 11. Chương trình phản ứng PCR lần 1 – PCR lồng**

Số bước	Chu kỳ	Nhiệt độ ( $^\circ\text{C}$ )	Thời gian	Số chu kỳ
1	Biến tính ADN	95	5 phút	1
2	Biến tính ADN	94	1 phút	}25
3	Bắt cặp môi	58	2 phút	
4	Tổng hợp ADN	72	2 phút	
5	Tổng hợp lần cuối	72	10 phút	1

Sau đó giữ ở nhiệt độ  $15^\circ\text{C}$  cho đến khi lấy ra khỏi máy

- Đặt các ống mẫu vào máy PCR, đậy nắp và chạy máy theo chương trình đã thiết lập;

- Sau khi chu trình chạy kết thúc, lấy mẫu ra khỏi máy, tắt máy;

- Sử dụng ngay hoặc lưu mẫu ở ngăn mát của tủ lạnh thường.

#### 4.4.4 Tiến hành thực hiện phản ứng PCR lần 2

##### a. Chuẩn bị hỗn hợp dung dịch phản ứng PCR lần 2

- Lấy hóa chất từ tủ âm  $-20^{\circ}\text{C}$  ra, để tan đá ở nhiệt độ phòng trong khoảng 15 phút (ngoại trừ Taq DNA polymerase). Trộn đều các ống hóa chất bằng máy lắc vortex ở tốc độ 900 vòng/phút trong 10 giây và ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 15 giây;

- Chuẩn bị và ghi ký hiệu mẫu lên ống PCR theo danh sách mẫu phân tích, mẫu chứng dương và chứng âm;

- Trộn thành phần phản ứng PCR trong ống 1,5 ml theo bảng sau. Với mỗi loài KSTSR cần chuẩn bị 01 ống hỗn hợp cho phản ứng PCR riêng (4 loài cần 4 ống hỗn hợp phản ứng);

**Bảng 12. Pha dung dịch phản ứng PCR lần 2 – PCR lồng**

Hóa chất cho PCR lần 2	Thể tích ( $\mu\text{l}$ )	Thể tích cho n phản ứng ( $\mu\text{l}$ )
Nước cất khử ion	12,8	12,8 x (n+1)
10X PCR buffers ( $\text{MgCl}_2$ 15mM)	2,5	2,5 x (n+1)
dNTPs 2 mM	2,5	2,5 x (n+1)
Môi xuôi (1,25 $\mu\text{M}$ )*	2,5	2,5 x (n+1)
Môi ngược (1,25 $\mu\text{M}$ )*	2,5	2,5 x (n+1)
Taq DNA polymerase (5 đơn vị/ $\mu\text{l}$ )	0,2	0,2 x (n+1)
Tổng	23	23 x (n+1)

Chú ý: \* môi xuôi, môi ngược cho từng loài KSTSR tham khảo bảng trình tự môi ở trên.

- Cất các hóa chất vào tủ âm  $<- 20^{\circ}\text{C}$ ;

- Trộn đều hỗn hợp dung dịch PCR bằng máy lắc vortex ở tốc độ 900 vòng/phút trong 10 giây và ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 15 giây;

- Chia đều hỗn hợp cho các ống phản ứng với thể tích 23  $\mu\text{l}$ /phản ứng.

**b. Nạp mẫu:** thực hiện tại phòng pha loãng mẫu.

- Chuyển sản phẩm PCR lần 1 vào phòng pha loãng mẫu;

- Ly tâm sản phẩm PCR lần 1 ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 giây;

- Lấy 2  $\mu\text{l}$  sản phẩm PCR lần 1 cho vào ống phản ứng PCR 2 theo đúng ký hiệu mẫu;

- Lấy 2  $\mu\text{l}$  nước cất khử ion cho vào ống chứng trắng;

- Cất mẫu PCR lần 1 vào tủ âm  $<- 20^{\circ}\text{C}$ .

**c. Chạy phản ứng PCR lần 2:** trên máy luân nhiệt, thực hiện tại phòng máy PCR

- Đặt chương trình phản ứng PCR lần 2 như sau;



**Bảng 13. Chương trình phản ứng PCR lần 1 – PCR lồng**

Số bước	Chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	Biên tính ADN	95	5 phút	1
2	Biên tính ADN	94	1 phút	}30
3	Bắt cặp môi	58	2 phút	
4	Tổng hợp ADN	72	2 phút	
5	Tổng hợp lần cuối	72	10 phút	1
Sau đó giữ ở nhiệt độ 15°C cho đến khi lấy ra khỏi máy				

- Đặt các ống mẫu vào máy PCR, đậy nắp và chạy máy theo chương trình đã thiết lập;

- Sau khi chu trình chạy kết thúc, lấy mẫu ra khỏi máy, tắt máy;

- Chuyển mẫu sang phòng phân tích mẫu và cất mẫu ở ngăn mát của tủ lạnh thường.

#### 4.4.5. Điện di

Theo Mục 3.4.3, Phần III, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh sốt rét

#### 4.5. Phân giải kết quả xét nghiệm

##### 4.5.1. Đọc kết quả

Kết quả của quy trình là các sản phẩm nhân bản ADN biểu thị bằng các băng sáng dưới đèn tử ngoại.

Trong trường hợp các chứng âm tách chiết, chứng trắng không tạo ra các băng sáng dưới ánh đèn tử ngoại.

Các chứng dương có kết quả:

- Chứng dương *P.falciparum* : 205 bp.

- Chứng dương *P.vivax*: 120 bp

- Chứng dương *P. malaria*: 144 bp

- Chứng dương *P.ovale*: 800 bp

Kết quả xét nghiệm được ghi nhận như sau:

- Âm tính: cột chạy không hiện băng.

- Dương tính: với từng loài KST SR các băng điện di có kích thước tương ứng với các chứng dương ở trên

+ *P.falciparum* : 205 bp.

+ *P.vivax*: 120 bp

+ *P. malaria*: 144 bp

+ *P.ovale*: 800 bp

Với kỹ thuật này 1 mẫu luôn có 4 cột điện di, nếu 1 trong 4 cột có băng điện di với kích thước tương ứng ở trên, xác định là mẫu nhiễm đơn loài ký sinh trùng đó, trong trường hợp có từ 2 - 4 cột điện di đều có băng với kích thước tương ứng thì được xác định là nhiễm phối hợp.

Trong trường hợp chứng âm, chứng dương không đúng thì không ghi nhận kết quả xét nghiệm. Kiểm tra lại toàn bộ quá trình xét nghiệm để quyết định tiến hành lại xét nghiệm từ bước nào.

#### **4.5.2. Nhận định kết quả**

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

- Trường hợp chứng âm phản ứng âm tính mà chứng âm tách chiết dương tính thì làm lại từ khâu tách chiết.

Kết quả của phương pháp PCR lồng không cho kết quả rõ ràng hoặc trong trường hợp cần khẳng định chính xác kết quả, phòng xét nghiệm có thể yêu cầu lấy lại bệnh phẩm và xét nghiệm theo thường quy của phòng từ bước nhận bệnh phẩm hoặc phòng xét nghiệm sẽ xét nghiệm bằng phương pháp Realtime PCR, PCR đa môi bán lồng và ngược lại.

#### **4.5.3. Ghi chép và báo cáo**

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán sốt rét bằng kỹ thuật xét nghiệm PCR đa môi bán lồng.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

### **5. Phương pháp xét nghiệm xác định 4 loài ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* gây bệnh cho người trên mẫu máu bằng kỹ thuật realtime PCR**

Được áp dụng trong các trường hợp nghi ngờ sốt rét, xác định bằng các kỹ thuật trên không phát hiện thấy ký sinh trùng sốt rét; những trường hợp soi lam nghi ngờ KSTSR có hình thể lạ, không điển hình, trường hợp các đang tiến hành loại trừ sốt rét, hoặc vùng nghi ngờ sốt rét quay trở lại thì có thể lấy thêm mẫu để làm xét nghiệm PCR khẳng định kết quả của các xét nghiệm trên. Đặc biệt có hiệu quả trong việc phát hiện ký sinh trùng lạnh và người mang KST không triệu chứng, tầm soát nguồn lây truyền bệnh. Kết quả xét nghiệm muộn trong vòng 2 giờ đến 2 ngày. Có thể lặp lại xét nghiệm như giống với trường hợp xét nghiệm bằng kỹ thuật nhuộm giem sa, soi kính hiển vi. Ngưỡng phát hiện khoảng 0,5-5 KST/ $\mu$ l máu đầu ngón tay.

Kỹ thuật được khuyến cáo sử dụng để khẳng định kết quả loại trừ sốt rét, xét nghiệm ca bệnh ở những vùng kiểm soát sốt rét quay trở lại.

#### **5.1. Phạm vi áp dụng**

Phương pháp này áp dụng cho việc xét nghiệm ký sinh trùng sốt rét trong mẫu máu mao mạch, thu thập từ đầu ngón tay; hoặc máu tĩnh mạch được bảo quản khô trên giấy thấm hoặc mẫu máu tươi không chống đông hoặc chống đông với EDTA bằng cách nhận diện gen đặc trưng của ký sinh trùng sốt rét qua phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase thời gian thực – realtime PCR.

#### **5.2. Nguyên lý**

Nguyên lý của xét nghiệm tương tự như nguyên lý xét nghiệm bằng kỹ thuật PCR. Quá trình xét nghiệm gồm 5 phản ứng real-time PCR. Phản ứng PCR thứ nhất nhằm khuếch đại và phát hiện đoạn gen đặc trưng cho ký sinh trùng sốt rét gây bệnh trên người, giống Plasmodium; Nếu mẫu bệnh

phẩm dương tính với KSTSR sẽ tiến hành real-time PCR để định loài: xác định *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*.

Nguyên lý của kỹ thuật real-time Taq man PCR là: các cặp mồi được thiết kế đặc hiệu cho từng loài KST dựa trên trình tự gen của chúng; 1 trong 2 mồi được gắn với các chất phát huỳnh quang đặc hiệu như FAM, VIC, HEX...; mỗi loài KST còn được có một mẫu dò (probe) đặc hiệu được đánh dấu đầu 5' bằng nhóm phát huỳnh quang (reporter dye), và đầu 3' bằng nhóm dập tắt huỳnh quang (quencher dye). Nhóm “dập” sẽ ngăn sự phát huỳnh quang của nhóm “phát” khi mẫu dò ở trạng thái nguyên vẹn. Trong quá trình khuếch đại ADN, hoạt tính 5' exonuclease của Taq polymerase sẽ cắt rời nhóm “phát” khỏi mẫu dò, khiến nó không còn chịu tác động của nhóm “dập”. Lúc đó nhóm “phát” sẽ phát tín hiệu huỳnh quang và máy real-time sẽ thu thập các tín hiệu này, tạo thành các đường cong nóng chảy. Dựa vào các đường cong nóng chảy sẽ xác định có phản ứng khuếch đại không và định lượng được mật độ của gen đích ban đầu.

### 5.3. An toàn sinh học

Tuân thủ theo các yêu cầu và hướng dẫn về an toàn sinh học theo quy định hiện hành đối với Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp II.

### 5.4. Thực hiện xét nghiệm

#### 5.4.1. Mẫu bệnh phẩm

Thực hiện theo hướng dẫn mô tả trong Mục 3.4.1, Phần III, bệnh sốt rét này.

#### 5.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao

##### a. Chuẩn bị chứng và mẫu

- Mẫu xét nghiệm là ADN được tách chiết từ phần trên
- Chứng dương là ADN của KST SR: *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale*

- Chứng âm là:

- + Chứng âm tách chiết
- + Chứng trắng cho phản ứng PCR lần 1: nước cất được thêm vào ống đối chứng khi nạp mẫu phản ứng PCR lần 1.
- + Chứng trắng cho phản ứng PCR lần 2: nước cất được thêm vào ống đối chứng khi nạp mẫu phản ứng PCR lần 2.

##### b. Sinh phẩm, hóa chất dùng cho phản ứng PCR

Các hóa chất sử dụng cho quá trình xét nghiệm giống như hóa chất dùng trong phản ứng PCR đa mồi bán lồng (Điểm b, Mục 4.4.2, Phần III, bệnh sốt rét này) và có bổ sung như sau:

- Realtime-PCR master mix 2X
- Trình tự bộ mồi và đầu dò:

**Bảng 14. Trình tự mồi và Probe của kỹ thuật real-time PCR**

Mồi và đầu dò	Trình tự mồi
Pan xuôi	GTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC AGA TA

<b>Môi và đầu dò</b>	<b>Trình tự môi</b>
Pan ngược	AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AAG
Pf xuôi	ATT GCT TTT GAG AGG TTT TGT TAC TTT
Pf ngược	GCT GTA GTA TTC AAA CAC AAT GAA CTC AA
Po xuôi	CCG ACT AGG TTT TGG ATG AAA GAT TTT T
Po ngược	CAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA TAA
Pm xuôi	AGT TAA GGG AGT GAA GAC GAT CAG A
Pm ngược	CAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA TAA
GADPH xuôi	CCT CCC GCT TCG CTC TCT
GADPH ngược	GCT GGC GAC GCA AAA GA
Pv xuôi	ACG ATT TGG CTG GAG CAG AT
Pv ngược	TCT CTA TTC CAT TCT TTG TCA CTC TTT C
Đầu dò Pan	VIC-TCG TAA TCT TAA CCA TAA AC
Đầu dò Pf	FAM-CAT AAC AGA CGG GTA GTC AT
Đầu dò Po	VIC-CGA AAG GAA TTT TCT TAT T
Đầu dò GADPH	VIC-CCT CCT GTT CGA CAG TCA GCC GC
Đầu dò Pv	FAM-GTA ATA GTA ACA GCT GGA TTT ACC AAG GCC CCA-TAMRA
Đầu dò Pm	Cyan500-CAGGGAATAGAG G GTTG-BlackB

### 5.4.3. Tiến hành thực hiện phản ứng realtime PCR lần 1

**a. Chuẩn bị hỗn hợp dung dịch PCR lần 1:** Thực hiện tại phòng chuẩn bị phản ứng PCR

- Lấy hóa chất từ tủ  $-20^{\circ}\text{C}$  ra, để tan đá ở nhiệt độ phòng (ngoại trừ Taq DNA polymerase). Trộn đều các ống hóa chất bằng máy vortex 10 giây ở tốc độ 900 vòng/phút và ly tâm nhanh ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 15 giây.

- Chuẩn bị và ghi ký hiệu mẫu lên ống PCR theo danh sách mẫu phân tích, mẫu chứng dương và chứng âm

- Trộn thành phần phản ứng PCR trong ống 1,5 ml theo bảng sau

**Bảng 15. Pha dung dịch phản ứng realtime PCR lần 1**

<b>Hóa chất cho PCR 1</b>	<b>Thể tích mẫu (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Thể tích cho n phản ứng (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
Hỗn hợp phản ứng Real time PCR master mix 2X	12,5	12,5 x (n+1)
Hỗn hợp môi và đầu dò cho gen GAPDH trên người	1,25	1,25 x (n+1)

Hóa chất cho PCR 1	Thể tích mẫu (μl)	Thể tích cho n phản ứng (μl)
Hỗn hợp môi và đầu dò cho giống Plasmodium	1,25	1,25 x (n+1)
Nước khử ion không chứa Nuclease	5	5 x (n+1)

- Cất các hóa chất vào tủ lạnh ở điều kiện -20°C
- Trộn đều hỗn hợp dung dịch PCR bằng máy vortex 10 giây ở tốc độ 900 vòng/phút và ly tâm nhanh ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 giây.
- Chia đều hỗn hợp cho các ống phản ứng với thể tích 20 μl.
- b. Nạp mẫu:** Thực hiện tại phòng tách chiết và nạp mẫu
  - Lấy các ống mẫu ADN trong tủ lạnh -20°C ra, để tan đá ở nhiệt độ phòng, ly tâm nhanh ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 giây.
  - Lấy 5μl dung dịch ADN khuôn cho vào ống hỗn hợp phản ứng theo đúng ký hiệu mẫu từ biểu mẫu
  - Lấy 5μl nước cất khử ion vào ống chứng trắng.
  - Lấy 5μl ADN chứng dương của 4 loài ký sinh trùng sốt rét cho vào các ống chứng dương tương ứng.
  - Cất mẫu ADN khuôn còn lại vào tủ lạnh sâu <-20°C.

**Chú ý:** cứ 11 xét nghiệm thì có 1 mẫu chứng âm tách chiết, mỗi lần tiến hành PCR đều bắt buộc có chứng trắng và chứng dương. Trình tự các mẫu sắp xếp như sau: mẫu xét nghiệm, mẫu chứng âm tách chiết, mẫu chứng trắng, mẫu chứng dương.

**c. Các bước tiến hành phản ứng PCR:** Thực hiện tại phòng máy PCR

Đặt chương trình phản ứng PCR lần 1 như sau

**Bảng 16. Cài đặt chu trình phản ứng realtime PCR lần 1**

Số bước	Chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1		50	2 phút	1
2	Biến tính ADN	95	10 phút	
3	Biến tính ADN	95	15 giây	40
4	Bắt cặp môi	60	1 phút	

Đặt các ống mẫu vào máy PCR, đậy nắp và chạy máy theo chương trình đã thiết lập.

#### 5.4.4. Tiến hành thực hiện phản ứng realtime PCR lần 2

Mẫu xét nghiệm cho phản ứng real-time PCR lần 2 là mẫu đã được xác định dương tính với phản ứng real-time PCR lần 1.

**a. Chuẩn bị hỗn hợp dung dịch phản ứng PCR lần 2:** tương tự như lần 1, thành phần phản ứng PCR trong ống 1,5 ml theo bảng sau, mỗi loài KST một ống hỗn hợp phản ứng riêng; với 1 mẫu để phân biệt 4 loài cần 4 ống phản ứng PCR lần 2.

**Bảng 17. Thể tích dung dịch phản ứng PCR lần 2- real-time PCR**

Hóa chất cho PCR 2	Thể tích (μl)	Thể tích cho n phản ứng (μl)
Hỗn hợp phản ứng Real time PCR master mix 2X	12,5	12,5 x (n+1)
Hỗn hợp môi và đầu dò cho 1 loài ký sinh trùng sốt rét*	1,25	1,25 x (n+1)
Nước khử ion không chứa Nuclease	9,25	9,25 x (n+1)

Chú ý: môi xuôi, môi ngược, probe cho từng loài KSTSR tham khảo bảng trình tự môi bảng 14.

- Trộn đều hỗn hợp dung dịch PCR bằng máy vortex 10 giây trong 900 vòng/phút và ly tâm nhanh ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 15 giây.

- Chia đều hỗn hợp cho các tuýp phản ứng với thể tích 23 μl

**b. Nạp mẫu:** Thực hiện tại phòng tách chiết và nạp mẫu

- Lấy các ống sản phẩm PCR lần 1 trong tủ lạnh -20°C ra, để tan đá ở nhiệt độ phòng, ly tâm nhanh ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 giây.

- Lấy 2μl dung dịch ADN khuôn cho vào ống hỗn hợp phản ứng theo đúng ký hiệu mẫu từ biểu mẫu

- Lấy 2μl nước cất khử ion vào ống chứng trắng.

- Lấy 2μl ADN chứng dương của 4 loài ký sinh trùng sốt rét cho vào các ống chứng dương tương ứng.

**c. Các bước tiến hành phản ứng PCR:** Thực hiện tại phòng máy PCR

- Đặt chương trình phản ứng PCR lần 2 như sau

**Bảng 18. Cài đặt chu trình phản ứng realtime PCR lần 2**

Pha	Mô tả	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	Hoạt hóa Taq polymerase	95°C	15 phút	1
2	Khuếch đại	95°C	15 giây	45
		60°C	1 phút	

- Đặt các ống mẫu vào máy real-time PCR, đậy nắp và chạy máy theo chương trình đã thiết lập.

- Sau khi chu trình chạy kết thúc, lấy mẫu ra khỏi máy, tắt máy.

### 5.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

#### 5.5.1. Đọc kết quả

Kết quả của quy trình là các sản phẩm nhân bản ADN biểu thị bằng giá trị Ct, đường biểu diễn khuếch đại và đường định chuẩn trên máy real-time PCR.

#### a) Trường hợp định tính:

Kết quả chỉ được ghi nhận khi:

- Chứng âm: đường biểu diễn khuếch đại không vượt quá đường huỳnh quang nền.

- Chứng âm tách chiết: đường biểu diễn khuếch đại không vượt quá đường huỳnh quang nền.

- Chứng dương: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 40 của phản ứng.

Thì ghi nhận kết quả như sau:

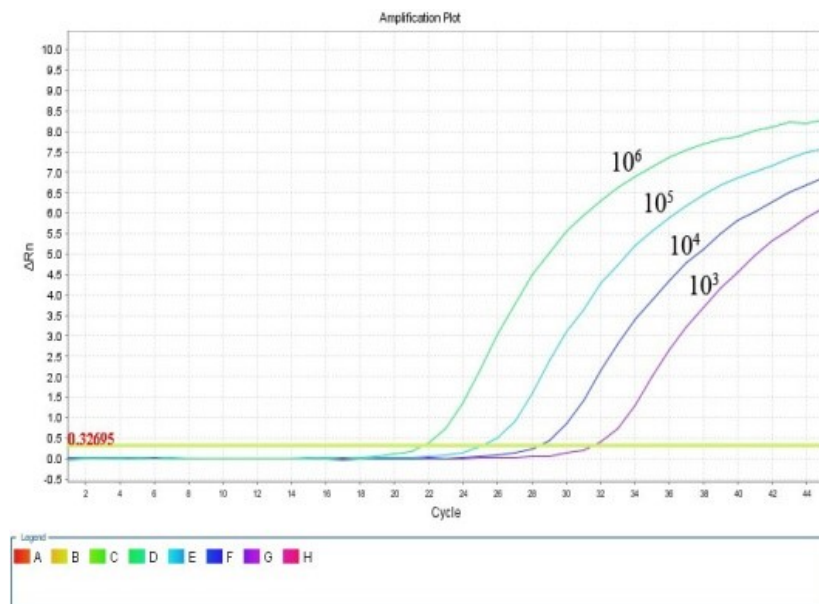
- Mẫu âm tính: đường biểu diễn khuếch đại không vượt quá đường huỳnh quang nền.

- Mẫu dương tính: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận trước hoặc tại chu kỳ thứ 40 của phản ứng.

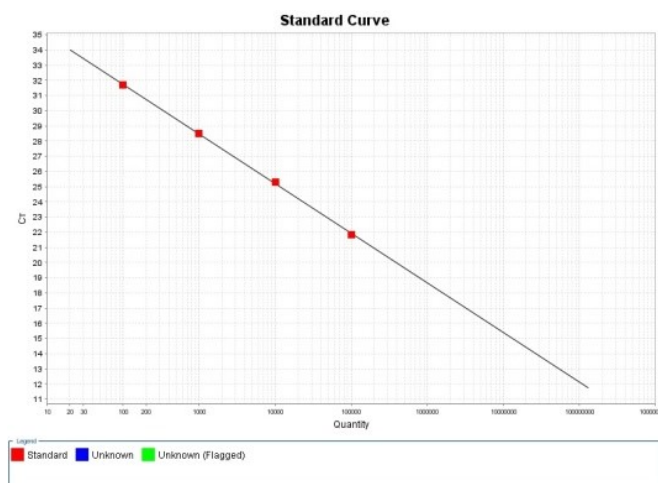
### b) Trường hợp định lượng:

Trong trường hợp định lượng với mỗi một đợt chạy mẫu của 1 loài ký sinh trùng, phải kèm theo ít nhất 5 mẫu chứng dương được pha loãng theo mũ số  $10^{-}$  từ mẫu đã biết trước nồng độ để xây dựng đường định chuẩn.

Trong trường hợp các chứng âm tách chiết, chứng trắng có đường biểu diễn khuếch đại dưới đường nền. Các chứng dương có mật độ pha loãng khác nhau tạo thành đường định chuẩn với Hệ số tương quan  $R^2 \geq 0,99$ ; Hệ số thu hồi Eff%: 95 -105% thì các kết quả định lượng được ghi nhận giá trị  $\log_{10}$  tương đương với số bản sao có trong mẫu xét nghiệm.



Hình 1: Đường biểu diễn khuếch đại



**Hình 2: Đường định chuẩn xác định hiệu suất của phản ứng real-time**

### 5.5.2. Nhận định kết quả

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

Nếu trong trường hợp phương pháp Realtime PCR vẫn cho kết quả không rõ thì mẫu bệnh phẩm này sẽ được lặp lại từ bước tách chiết mẫu và có thể chạy song song các phương pháp PCR lồng, PCR đa môi bán lồng và Realtime PCR; hoặc PXN có thể yêu cầu lấy lại bệnh phẩm và xét nghiệm theo thường quy của phòng từ bước nhận bệnh phẩm.

### 5.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán sốt rét bằng kỹ thuật xét nghiệm real-time PCR.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## IV. Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2011), Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương, *Cẩm nang phòng chống bệnh sốt rét*, Nhà xuất bản Y học, tr 28 - 35;
2. Bộ Y tế (2008), *Ký sinh trùng thực hành*, Nhà xuất bản Giáo dục, tr 65 – 79;
3. Bộ Y Tế (2009), Dự án Quốc gia phòng chống sốt rét, *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị sốt rét*, tr. 6-7;
4. Dự án Quốc gia phòng chống sốt rét (2000), *Bệnh sốt rét, bệnh học – lâm sàng và điều trị*, Nhà xuất bản Y học, tr.258 – 275;
5. World Health Organization, *Basic Malaria Microscopy: Part 1. Learn's handbook*, pp. 14-24;



6. WHO (2010), *Basic Malaria Microscopy, Part 1. Learner's guide, Second edition*, pp.21 – 35, 69 – 75;
7. WHO (2012), *Malaria slide bank, standard operating procedures*, version 4, pp. 10-27;
8. WHO, John Storey – WPRO, *Draft (Generic) SOPs for GM microscopy*, pp. 13-25.
9. Frederic L., R. Tejerinaa, C. Aliagaa, R. Ursic-Bedoyac, C. Lowenbergerc, T. Chavezb, (2008). Optimization of a semi-nested multiplex PCR to identify Plasmodium parasites in wild-caught Anopheles in Bolivia, and its application to field epidemiological studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 485—492.
10. Nateghpour M., H. Abed Khojasteh, H. Keshavarz, H. Hajjran, Gh. Edrissian, A. Rahimi and N. Gobakhloo (2011). Comparison of microscopical examination and semi-nested multiplex polymerase chain reaction in diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Eastern Mediterranean Health Journal.* 17 (1): 51-55.
11. Rubio, J., Benito, A., Berzosa, P., Roche, J., Puente, S., Subirats, M., Lopez-Velez, R., Garcia, L., Alvar, J., (1999). Usefulness of Seminested Multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3260—3264.
12. Rubio, J., Benito, A., Roche, J., Berzosa, P., Garcia, M., Mico, M., Edu, M., Alvar, J., (1999). Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 183—187.
13. Rubio, J.M., Post, R.J., Docters van Leeuwen, W.M., Henry, M.C., Lindergard, G., Hommel, M., (2002). Alternative polymerase chain reaction method to identify Plasmodium species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnMPCR). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 199—204.
14. Steve M. T., Jonathan J. J., Paul A. T., Jennifer B. G., Sarah H. L., Paluku K., Antoinette K. T. and Steven R. M. (2010). High-Throughput Pooling and Real-Time PCR-Based Strategy for Malaria Detection. *Journal of clinical microbiology:* 512-519.
15. Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S. and Brown, K.N. (1993) Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the Polymerase Chain Reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 283-292.

## **BỆNH VIÊM MÀNG NÃO DO NÃO MÔ CẦU (Meningitis meningococcus)**

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

### **I. Mô tả chung**

*Neisseria meningitidis*, thường gọi là não mô cầu là tác nhân gây bệnh cho người và được phát hiện trong dịch não tủy của bệnh nhân viêm màng não cấp tính. Vi khuẩn này phân lập được vào năm 1887 bởi Anton Weichselbaum, đến năm 1903 thì hai tác giả Albrecht và Ghon đã mô tả chi tiết và đặt tên cho vi khuẩn là *Micrococcus meningitidis* (meninges, màng não). Năm 1929, Murray đã chuyển chúng sang chi *Neisseria*; từ đó cho đến nay, vi khuẩn có tên chính thức là *Neisseria meningitidis*. Não mô cầu thuộc họ *Neisseriaceae*, chi *Neisseria*, loài *Neisseria meningitidis* là nguyên nhân chính gây viêm màng não mủ lây thành dịch trên toàn thế giới.

Hầu hết các trường hợp viêm màng não trên toàn thế giới đang gây ra bởi sáu nhóm huyết thanh (A, B, C, X, Y, W-135). Năm 1996-1997 ở châu Phi, nhóm huyết thanh A đã gây ổ dịch não mô cầu lớn nhất ước tính có 300.000 trường hợp nhiễm não mô cầu và 30.000 trường hợp tử vong. Hiện nay, nhóm huyết thanh B là nguyên nhân quan trọng nhất của bệnh lưu hành ở các nước phát triển, gây ra 30-40% người mắc bệnh ở Mỹ và 80% ở châu Âu. Nhóm huyết thanh C cũng gây dịch ở các nước phát triển, chiếm 30% bệnh ở Mỹ và Châu Âu. Nhóm huyết thanh Y đã nổi lên tại Mỹ và chiếm hơn một phần tư của bệnh do viêm màng não ở Mỹ trong thập kỷ qua. So với những năm đầu thập niên 1990, thì nhóm huyết thanh Y chiếm là 2% trong năm 1989-1991, tỷ lệ tăng lên đến 32,6% vào năm 1996 và nhóm huyết thanh Y vẫn chiếm 26% (2007) bệnh não mô cầu. Nhóm huyết thanh Y gây bệnh viêm phổi, viêm màng não ở người lớn tuổi và gây viêm màng não ở trẻ dưới 6 tháng tuổi. Gần đây, nhóm huyết thanh Y gây viêm màng não tại Nam Phi, Nam Mỹ và Israel.

### **II. Yêu cầu chung:**

#### **1. Nhân sự**

- Người thực hiện: Kỹ thuật viên xét nghiệm đã được đào tạo, tập huấn 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.

- Tất cả nhân viên kỹ thuật xét nghiệm cần được đào tạo về sử dụng trang thiết bị, đào tạo về thực hành ATSH và thực hành vi sinh chuẩn, đào tạo về đảm bảo chất lượng xét nghiệm. Nhân viên xét nghiệm được đào tạo các nội dung sẽ được đánh giá năng lực định kỳ.

- Nhân viên mới sau khi đánh giá có kết quả đạt thì chính thức được thực hiện xét nghiệm một cách độc lập.

- Nhân viên xét nghiệm thực hiện kỹ thuật chẩn đoán vi khuẩn *N. meningitidis* (ngoại trừ xét nghiệm nhanh, soi kính hiển vi) nên tiêm vaccin viêm màng não do não mô cầu.

## 2. Cơ sở vật chất, trang thiết bị

### 2.1. Cơ sở vật chất

- Phòng xét nghiệm đạt tiêu chuẩn an toàn sinh học cấp II trở lên.

- Đối với xét nghiệm bằng kỹ thuật realtime PCR cần 3 phòng xét nghiệm riêng, bao gồm: phòng pha dung dịch phản ứng (1), phòng tách chiết ADN (2) và phòng đặt máy PCR(3). Dòng công việc được thực hiện theo thứ tự di chuyển như sau: (1) ⇒(2) ⇒ (3).

### 2.2. Trang thiết bị

**Bảng 1. Trang thiết bị**

Tên thiết bị	XN chẩn đoán nhanh	Nhuộm Gram	Nuôi cấy trên thạch	Nuôi cấy máy tự động	Định danh API	Định danh máy	rPCR
Tủ an toàn sinh học cấp II;	1 cái	1 cái	1 cái	1 cái	1 cái	1 cái	1 cái
Máy quay ly tâm có tốc độ quay cực đại $\geq 13000$ rpm	1 cái						
Các loại Pi pét	1 bộ		1 bộ		1 bộ	1 bộ	1 bộ
Que trộn	x						
Kính hiển vi		1 bộ	1 bộ	1 bộ	1 bộ	1 bộ	
Máy sấy lam kính		1 bộ	1 bộ	1 bộ	1 bộ	1 bộ	
Máy ly tâm		1 cái	1 cái				1 cái
Máy đo độ đục					1 cái	1 cái	
Tủ âm CO <sub>2</sub>			1 cái		1 cái		
Máy votex;						1 cái	1 cái
Dụng cụ để làm lạnh các ống PCR							1 bộ
Máy ly tâm loại nhỏ							1 bộ
Máy ủ nhiệt khô chuyên dụng							1 bộ
Máy Real time PCR							1 bộ
Các loại pipet 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l.							1 bộ
Máy cấy máu tự động				1 cái			

- Hồ sơ thiết bị gồm: hồ sơ xác nhận ban đầu của thiết bị, lý lịch thiết bị, hồ sơ hiệu chuẩn, bảo dưỡng của thiết bị, nhật ký theo dõi sử dụng thiết bị.

- Có danh sách thiết bị, hướng dẫn sử dụng thiết bị.

- Đào tạo cho các nhân viên vận hành thiết bị theo đúng hướng dẫn.

### **3. Bảo đảm chất lượng xét nghiệm**

#### **3.1. Trước xét nghiệm**

##### **3.1.1. Đảm bảo chất lượng mẫu đầu vào**

- Mẫu bệnh phẩm vô trùng tuyệt đối và được mang ngay tới khoa xét nghiệm.

- Đối với bệnh phẩm máu thì phải đưa ngay vào máy cấy máu tự động.

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

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

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

- Trước khi làm phải kiểm tra thuốc thử: các thuốc thử để phải để ở lọ đóng nắp chặt và còn hạn sử dụng;

- Kiểm tra thuốc thử xem có cạn không trước khi sử dụng, nếu có phải lọc lại

- Giữ thuốc thử nhuộm tránh tác động trực tiếp của ánh sáng mặt trời;

- Kiểm tra chất lượng thuốc nhuộm với mỗi lô sản xuất và hàng tuần với chủng chuẩn ví dụ: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213;

- Môi trường nuôi cấy: đĩa thạch máu (BA) và sô cô la (CA) phải kiểm tra với chủng chuẩn (ATCC) theo mỗi lô sản xuất trước khi sử dụng và còn hạn sử dụng

Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy.

#### **3.2. Trong xét nghiệm**

##### **3.2.1. Nội kiểm**

- Kiểm soát mẫu chủng chuẩn: Mẫu chủng chuẩn luôn được kiểm tra trong nhuộm Gram, nuôi cấy, PCR, test nhanh và cùng mẫu bệnh phẩm.

- Kiểm soát môi trường sử dụng trong nuôi cấy: kiểm tra trên chủng chuẩn mỗi lô.

- Kiểm soát mẫu chứng cho mỗi lần chạy PCR.

Chứng âm:

+ Chứng âm phản ứng (NTC): phải cho kết quả âm tính đối với phương pháp RT-PCR hoặc/và realtime RT-PCR

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

Chứng dương: Mẫu chủng chuẩn hoặc tương đương.

##### **3.2.2. Đánh giá từ bên ngoài**

Tham gia đánh giá từ bên ngoài (ngoại kiểm, liên phòng hoặc phòng xét nghiệm tham chiếu).

### **3.3. Sau xét nghiệm**

#### **3.3.1. Lưu trữ mẫu**

- Mẫu bệnh phẩm được bảo quản, lưu trữ trong tủ lạnh ngăn mát theo thời gian quy định.

#### **3.3.2. Tiêu hủy mẫu**

- Mẫu bệnh phẩm bị từ chối (không đạt tiêu chuẩn)  
- Mẫu bệnh phẩm hết thời hạn lưu giữ  
- Cho bệnh phẩm cần hủy vào túi rác thải y tế, buộc miệng túi. Sử dụng túi nhựa hấp được, không bị rò rỉ, có quy định màu sắc, ký hiệu rõ ràng trên túi để đựng mẫu và đem đi hấp ưót ở 121°C trong 30 phút.

- Dán băng dính chỉ thị nhiệt.

- Sau khi hoàn tất, lấy túi rác thải và kiểm tra băng dính chỉ thị nhiệt.

- Ghi chép toàn bộ quá trình hủy bệnh phẩm vào biểu mẫu.

### **4. Đọc và đánh giá kết quả**

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

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

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

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

Tham khảo mục 5, Phần II, Hướng dẫn xét nghiệm bệnh cúm.

### **III. Phương pháp xét nghiệm**

Bệnh phẩm để làm xét nghiệm xác định não mô cầu có thể là dịch não tủy, máu, dịch ngoáy họng mũi, mụn (tử ban trên da). Xét nghiệm trên dịch não tủy có thể thực hiện test nhanh, nhuộm Gram, PCR và cấy dịch não tủy. Bệnh phẩm máu dùng để cấy tự động. Tùy theo điều kiện trang thiết bị phù hợp có thể lựa chọn phương pháp xét nghiệm tối ưu.

Các phương pháp xét nghiệm bao gồm

- Xét nghiệm chẩn đoán nhanh (RDT)

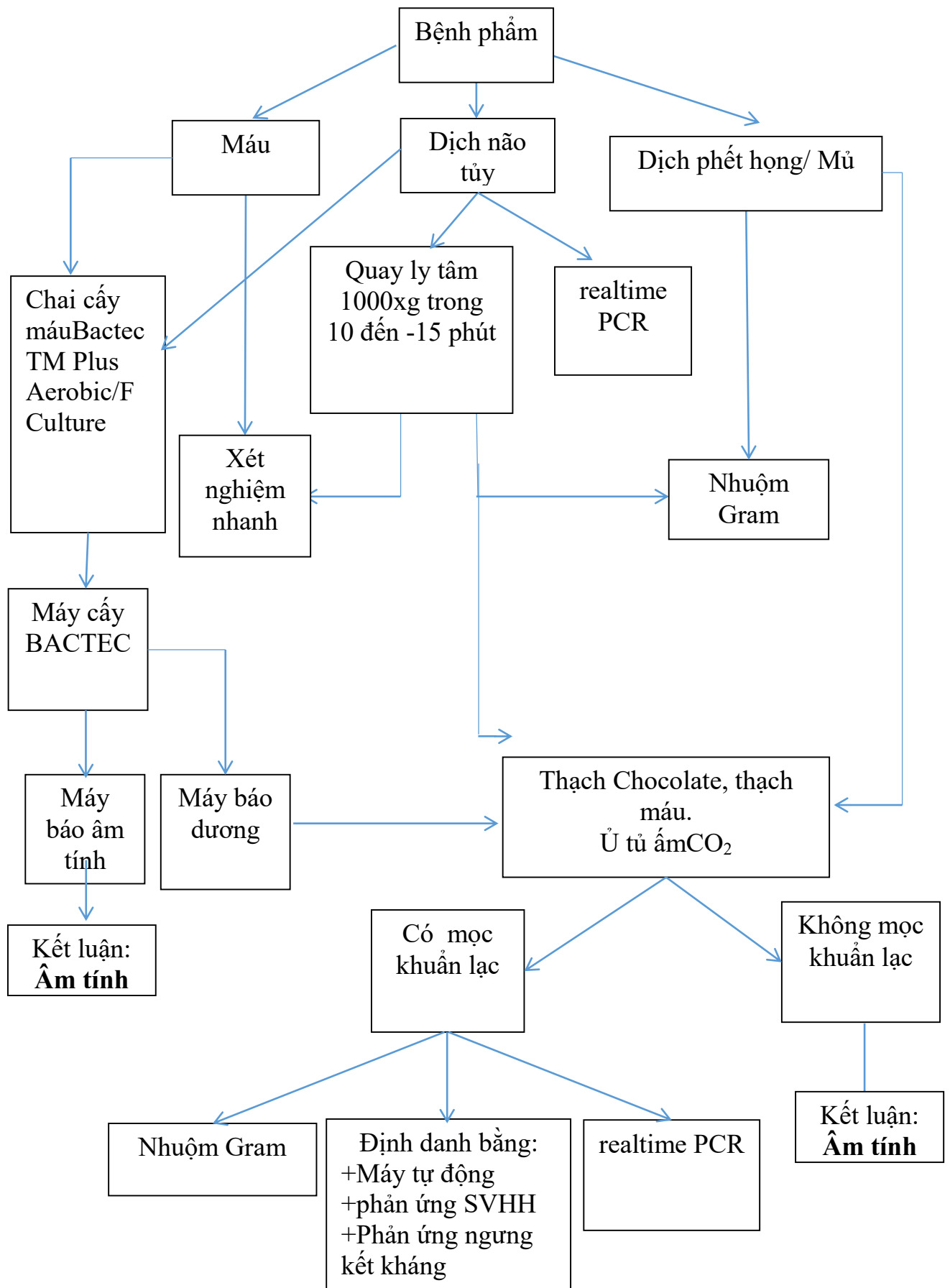
- Phương pháp hiển vi (nhuộm Gram)

- Nuôi cấy trên thạch

- Nuôi cấy Bactec

- Định danh (API, định danh bằng máy tự động)

- Sinh học phân tử : realtime PCR



Sơ đồ 1: Xét nghiệm xác định *Neisseria meningitidis*

## **1. Phương pháp chẩn đoán nhanh (RDT):**

### **1.1. Phạm vi áp dụng :**

Xét nghiệm xác định chẩn đoán viêm não mô cầu bằng cách phát hiện các kháng nguyên của vi khuẩn *N. meningitidis* trong dịch não tủy bằng kỹ thuật ngưng kết hạt latex. Độ nhạy khoảng trên 60% và độ đặc hiệu khoảng trên 90% và có thể phát hiện các kháng nguyên *N. Meningitides* Group A/Y ; *N. meningitidis* Group C/W135; *N. meningitidis* Group B/E tùy theo từng kit thương mại.

### **1.2. Nguyên lý :**

Hạt latex (thể hữu hình) được phủ bởi kháng thể đơn dòng đặc hiệu đối với các kháng nguyên polysaccharide đặc hiệu tiết ra từ vi khuẩn *N. meningitidis* (thể vô hình). Kháng nguyên kết hợp với kháng thể tạo sự kết nối các hạt latex với nhau, tạo ra hiện tượng ngưng kết có thể phát hiện bằng mắt thường.

### **1.3. An toàn sinh học**

- Tránh để bệnh phẩm bắn ra tay và mắt, nếu để bắn ra tay ngay lập tức rửa bằng nước sạch. Trong trường hợp đánh đổ bệnh phẩm, phải cẩn thận làm sạch nơi bị đổ cùng với chất sát khuẩn theo quy trình xử lý đổ tràn.

### **1.4. Thực hiện xét nghiệm**

#### **1.4.1. Mẫu bệnh phẩm**

- Dịch não tủy: từ 3ml đến 5ml sau lấy phần nổi đã quay ly tâm 1000xg trong 5-10 phút.

- Huyết tương: 2ml.

- Khuẩn lạc: từ 3 đến 5 khuẩn lạc thuần nhất sau khi nuôi cấy. Khuẩn lạc dạng S, tròn, nhẵn, kích thước khoảng 0,5 - 1,0 mm, không màu hoặc xám nhạt thường nghĩ đến là từ vi khuẩn não mô cầu (song cầu Gram âm, oxidase dương).

Bệnh phẩm sau khi lấy xong phải được đưa ngay tới phòng xét nghiệm.

#### **1.4.2. Hóa chất, vật tư tiêu hao**

- Bộ kit được bảo quản theo quy định của nhà sản xuất.

- Pi pét hút

- Que trộn

- Dụng cụ:

+ Cồn I ốt và cồn 70%

+ Dung dịch sát khuẩn tay nhanh

+ Bơm tiêm vô trùng 5 ml, 10 ml

+ Hộp đựng bông, dây ga rô, kẹp

+ Lam kính; Đèn cồn; Dầu soi; Que cấy; Bút chì kính;

+ Giá để tiêu bản; Cốc đựng rác thải

#### **1.4.3. Các bước tiến hành**

Quy trình thực hiện có thể thay đổi tùy theo mỗi kit thương mại, cơ bản bao gồm các bước sau:

- Đưa sinh phẩm ra ngoài nhiệt độ phòng. Đánh số thứ tự các bệnh phẩm và số thứ tự trên tấm kính.

- Dùng pipet nhỏ 1 giọt bệnh phẩm vào ô tương ứng đã đánh số trên phiến kính. Nhỏ chứng dương và chứng âm.

- Lắc nhẹ nhàng lọ có chứa hạt latex và nhỏ một giọt vào cạnh giọt dịch não tủy của người bệnh.

- Trộn đều 2 loại với nhau bằng que trộn phủ đều bề mặt của mỗi ô.

- Lắc đều cả phiến kính bằng tay hoặc dùng máy lắc 80-100 vòng trong 10 phút.

### 1.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

#### 1.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

a) Đọc các ô chứng:

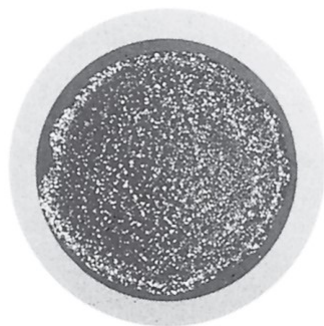
- Ô chứng dương: Ô có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy thô, có hạt ngưng kết rõ trên nền đen, dương tính với kháng thể đặc hiệu gắn kết với hạt latex.

- Ô chứng âm: Ô không có hiện tượng ngưng kết, hỗn dịch nhìn thấy mịn, đồng nhất.

b) Các ô bệnh phẩm:

- Dương tính: giống ô chứng dương.

- Âm tính: giống ô chứng âm.



Có ngưng kết



Không ngưng kết

### Hình 1: Đọc kết quả của phương pháp chẩn đoán nhanh

#### 1.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Các ô chứng âm và dương tính đạt

+ Ô bệnh phẩm âm tính: kết luận âm tính.

+ Ô bệnh phẩm dương tính: kết luận trong mẫu thử có kháng nguyên của *N. meningitidis* tương ứng.

Trong trường hợp dương tính không rõ, có thể do phản ứng không đặc hiệu: để bệnh phẩm trong bể ủ 100°C trong 3-5 phút để loại bỏ chất gây phản ứng không đặc hiệu, sau đó để lạnh ở nhiệt độ phòng và làm phản ứng lại.

- Các ô chứng âm và chứng dương không đạt: kít thuốc thử hỏng, không có kết luận cho xét nghiệm.



### 1.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán viêm màng não mô cầu bằng phương pháp chẩn đoán nhanh.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## 2. Phương pháp nhuộm Gram soi kính hiển vi

### 2.1. Phạm vi áp dụng:

Phương pháp áp dụng đối với mẫu bệnh phẩm dịch não tủy, mủ, họng và khuẩn lạc sau nuôi cấy. Mục đích để định hướng sơ bộ chẩn đoán dựa trên đặc điểm về hình thể, tính chất bắt màu qua nhuộm Gram.

### 2.2. Nguyên lý:

- Nhuộm Gram được dùng như một đặc tính phân loại quan trọng với nhiều vi khuẩn. Do sự khác biệt về cấu trúc vách tế bào nên trong quá trình nhuộm Gram, vi khuẩn Gram (+) sẽ giữ được phức hợp tím Gentian-iode mà không bị tẩy màu bởi cồn, trong khi đó vi khuẩn Gram (-) không giữ được phức hợp màu này, do vậy kết quả sau khi nhuộm là vi khuẩn Gram (+) vẫn giữ được màu tím của Gentian, còn vi khuẩn Gram (-) bắt màu hồng của Fuchsin

- 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.

### 2.3. An toàn sinh học

Thực hiện theo yêu cầu tại mục 1.3, phần III, nhóm bệnh này.

### 2.4. Thực hiện xét nghiệm

#### 2.4.1. Mẫu bệnh phẩm

- Dịch não tủy: từ 3ml đến 5ml sau lấy phần nổi đã quay ly tâm 1000xg trong 5-10 phút.

- Khuẩn lạc: từ 3 đến 5 khuẩn lạc thuần sau khi nuôi cấy.

- Dịch ngoáy họng;

- Dịch mủ;

Bệnh phẩm sau khi lấy xong phải được đưa ngay tới phòng xét nghiệm.

#### 2.4.2. Hóa chất, vật tư tiêu hao

- Máy ly tâm (cần cho một số loại bệnh phẩm)

- Kính hiển vi quang học

- Bộ thuốc nhuộm Gram

+ Tím gentian

+ Iodine /Lugol

+ Cồn 90°C

+ Đỏ fuchsin

- Lam kính

- Dụng cụ sấy lam (nếu có)

- Kẹp

- Bút ghi nhãn
- Dầu soi kính
- Giấy lau kính

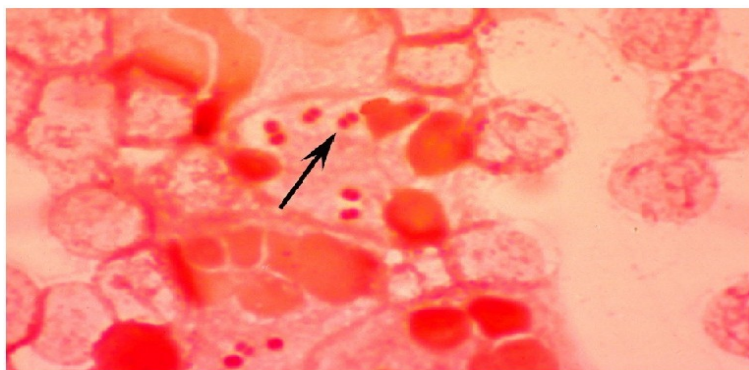
### 2.4.3. Các bước tiến hành

- Bước 1: làm tiêu bản
  - + Lấy lam mới và đốt trên ngọn lửa đèn cồn để làm sạch dầu;
  - + Ghi tên số bệnh phẩm phía đầu lam;
  - + Dùng que cấy vô khuẩn lấy mẫu bệnh phẩm đặt lên giữa lam kính và dàn từ trong ra ngoài tạo một hình tròn đường kính khoảng 1,5cm;
  - + Cố định bằng sự làm nóng: hơ trên ngọn lửa đèn cồn hoặc để lên máy sấy tiêu bản với nhiệt độ khoảng 60°C.
- Bước 2: Nhuộm Gram
  - + Để tiêu bản lên giá;
  - + Phủ thuốc nhuộm tím Gentian lên đầy tiêu bản và để 60 giây;
  - + Rửa nhẹ nhàng tiêu bản dưới vòi nước sạch;
  - + Phủ Iodine để khoảng 30 giây;
  - + Rửa tiêu bản nhẹ nhàng dưới vòi nước sạch;
  - + Phủ nhanh cồn để 10 giây;
  - + Rửa ngay tiêu bản dưới vòi nước sạch;
  - + Phủ Fuchsin để khoảng 60 giây;
  - + Rửa nhẹ nhàng dưới vòi nước sạch và để tiêu bản khô tự nhiên hoặc trên máy sấy lam.
- Bước 3: Soi kính hiển vi ở vật kính dầu độ phóng đại 100X

## 2.5. Phân giải kết quả xét nghiệm

### 2.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

- Xác định hình thể, kích thước, tính chất bắt màu, cách sắp xếp của vi khuẩn.
  - Tế bào bắt màu xanh tím: “Gram dương”
  - Tế bào bị khử màu tím bởi dung dịch acetone-ethanol và có màu đỏ khi nhuộm safranin: “Gram-âm”
  - Nghi 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.



Vi khuẩn có hình dạng của não mô cầu: song cầu Gram âm (mũi tên chỉ)

**Hình 2: Nhuộm Gram từ mẫu bệnh phẩm dịch não tủy**

**Lưu ý:**

- Trong trường hợp tây còn không đúng thời gian, rửa không kỹ sẽ làm sai lệch kết quả.

- Tuổi của mẫu cấy vi khuẩn ảnh hưởng đến tính chất nhuộm Gram ở các mẫu cấy vi khuẩn để thời gian quá lâu.

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

**2.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm**

- Ghi nhận: hình thể, cách sắp xếp của vi khuẩn, tính chất bắt màu.

**2.5.3. Ghi chép và báo cáo**

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán viêm màng não mô cầu bằng phương pháp nhuộm gram.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

**3. Phương pháp nuôi cấy**

**3.1. Phạm vi áp dụng :**

Phương pháp áp dụng đối với mẫu bệnh phẩm máu, dịch não tủy, mủ, họng. Nhằm nuôi cấy tăng sinh vi khuẩn *N. meningitidis* dựa vào tính chất sinh vật hóa học (SVHH) từ khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy.

**3.2. Nguyên lý :**

Nguyên lý nuôi cấy, phân lập: Bệnh phẩm được cấy vào môi trường thạch chocolate, thạch máu, để ở điều kiện khí trường và nhiệt độ phù hợp tạo điều kiện cho vi khuẩn phát triển tốt. Mục đích là làm tăng sinh vi khuẩn (nếu có) trong bệnh phẩm, các khuẩn lạc tách biệt được trên môi trường nuôi cấy.

**3.3. An toàn sinh học**

- Tuân thủ thực hiện thực hành vi sinh tốt trong phòng xét nghiệm

- Nhân viên xét nghiệm thực hiện kỹ thuật chẩn đoán vi khuẩn *N. meningitidis* nên tiêm vacxin viêm màng não do não mô cầu.

- Thực hiện bảo hộ cá nhân đầy đủ khi tiếp xúc với các bệnh phẩm và tránh nhiễm chéo và không lây nhiễm cho nhân viên y tế

- Xử lý các mẫu bệnh phẩm theo đúng quy trình và thao tác kỹ thuật cẩn thận, không để lây nhiễm ra môi trường

- Tiến hành quy trình kỹ thuật trong tủ an toàn sinh học cấp II

- Tránh để bệnh phẩm bắn ra tay và mắt, nếu để bắn ra tay ngay lập tức rửa bằng nước sạch. Trong trường hợp đánh đổ bệnh phẩm, phải cẩn thận làm sạch nơi bị đổ cùng với chất sát khuẩn để đảm bảo tính an toàn sinh học.

**3.4. Thực hiện xét nghiệm**

**3.4.1. Mẫu bệnh phẩm**

- Dịch não tủy: từ 3ml đến 5ml sau lấy phần nổi đã quay ly tâm 1000xg trong 10 phút.

- Dịch ngoáy họng;

- Dịch mủ;

### **3.4.2. Hóa chất, vật tư tiêu hao**

- Bút viết kính

- Que cấy (nhựa hoặc kim loại)

- Đèn cồn (nếu dùng que cấy kim loại)

- Thạch máu (BA): Blood AGAR BASE;

- Thạch Chocolate (CA): Columbia;

### **3.4.3. Các bước tiến hành**

#### **a. Nuôi cấy từ bệnh phẩm dịch não tủy**

- Bước 1: Chuẩn bị bệnh phẩm

+ Trộn đều bệnh phẩm

+ Dùng pipét hút 1,5 - 2 ml cho vào tuýp vô trùng 5 ml, rồi ly tâm với tốc độ 3000 vòng/10 phút

+ Bỏ phần nước nổi, lấy cặn để nhuộm soi và nuôi cấy.

- Bước 2: Kỹ thuật cấy

+ Lấy từ tủ lạnh 2 – 8°C 1 đĩa BA và 1 đĩa CA để ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút

+ Lấy 1 ống (khoảng 10 µl) cặn ly tâm ở trên, ria lên đĩa thạch (vùng nguyên ủy)

+ Tiệt trùng que cấy trên ngọn lửa đèn cồn, để nguội rồi cấy phân vùng (4 vùng)

+ Tiệt trùng que cấy;

+ Cho đĩa thạch vào tủ ấm 37°C, CO<sub>2</sub> 5 % 18 - 24 giờ sau nhận định vi khuẩn (nếu có) và theo dõi từ 24 giờ - 48 giờ;

- Bước 3: Làm tiêu bản nhuộm Gram với cặn còn lại.

#### **b. Nuôi cấy từ bệnh phẩm dịch họng, dịch mủ**

- Bước 1: Chuẩn bị bệnh phẩm

Lấy 1 đĩa BA, 1 đĩa CA đã ủ ấm trong 10 - 15 phút;

- Bước 2: Kỹ thuật cấy

+ Que tăm bông có bệnh phẩm cấy nguyên ủy lên bề mặt của đĩa thạch nuôi cấy;

+ Đốt que cấy để nguội sau đó cấy từ nguyên ủy trên môi trường rồi cấy phân vùng;

+ Cho đĩa BA, CA cho vào tủ ấm CO<sub>2</sub> ủ ở 37°C / 24h - 48h;

- Bước 3: Phết tiêu bản nhuộm Gram.

### **3.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm**

#### **3.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm**

- Nhận định tính chất bệnh phẩm dịch não tủy.

- Nhận định kết quả nhuộm soi cặn; vi khuẩn sau phân lập (nếu có);

- Nhận định tính chất khuẩn lạc: Khuẩn lạc thuần có dạng S, tròn, nhẵn, kích thước khoảng 0,5 – 1,0 mm, không màu hoặc xám nhạt.

#### **3.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm**

Ghi nhận: hình thể, cách sắp xếp của vi khuẩn, tính chất bắt màu của khuẩn lạc.

### **3.5.3. Ghi chép và báo cáo**

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán viêm màng não mô cầu bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## **4. Phương pháp cấy trên máy tự động (ví dụ trên máy BATEC)**

### **4.1. Phạm vi áp dụng :**

Xét nghiệm từ máu, dịch não tủy được nuôi cấy bằng máy tự động.

### **4.2. Nguyên lý :**

Trong chai cấy máu Bactec có môi trường tối ưu hóa cho mầm bệnh tương ứng phát triển. Khi vi khuẩn tăng sinh sẽ thực hiện quá trình trao đổi chất, thải khí Carbonic (CO<sub>2</sub>) vào môi trường. Lượng CO<sub>2</sub> này phản ứng với một chất nhuộm huỳnh quang có sẵn trong chai và huỳnh quang phát ra sẽ được hấp thu bởi một bộ phận cảm biến ánh sáng (Photo Detector). Tín hiệu nhận được sẽ được truyền tới máy tính để phân tích. Mức phát quang tương ứng với hàm lượng CO<sub>2</sub> vi sinh vật thải ra môi trường. Khi đạt đến một hàm lượng CO<sub>2</sub> nhất định (theo thông số mẫu dương tính đã được cài trước), máy sẽ báo dương. Nếu không có vi sinh vật phát triển, máy sẽ không phát hiện sự tăng nồng độ CO<sub>2</sub> trong chai cấy máu và sẽ báo âm tính sau một thời gian nhất định (đã được cài đặt trước).

### **4.3. An toàn sinh học**

Thực hiện theo yêu cầu mục 3.3, Phần III, nhóm bệnh này.

### **4.4. Thực hiện xét nghiệm**

#### **4.4.1. Mẫu bệnh phẩm**

- Máu tĩnh mạch: 8ml đến 10ml (trong trường hợp đặc biệt có thể lấy 3 - 10 ml máu).

- Dịch não tủy: từ 3ml đến 5ml.

#### **a. Chuẩn bị mẫu máu:**

- Lấy máu trong vòng 15 phút sau khi có giấy xét nghiệm tới. Kỹ thuật lấy máu như sau:

+ Chọn vị trí lấy máu: chọn tĩnh mạch nổi rõ nhất, thông thường lấy ở tĩnh mạch nếp gấp khuỷu tay, mu bàn tay hoặc cổ tay

+ Buộc dây ga rô để xác định vị trí lấy máu, tháo dây ga rô, sát khuẩn lại tay bằng dung dịch sát khuẩn tay nhanh

+ Dùng kẹp lấy bông thấm cồn - iod sát khuẩn da nơi lấy máu theo hình xoáy ốc từ trong ra ngoài, tạo một vùng có đường kính khoảng 5 cm. Thời gian sát khuẩn phải từ 30 giây đến 1 phút. Để khô tự nhiên 1 - 2 phút.

+ Không được chạm lại vào vùng đã sát khuẩn

+ Bật nắp bảo vệ chai máu, sát khuẩn nút chai bằng cồn 70%, để khô (không sử dụng iod để sát khuẩn nút chai)

+ Đeo găng tay y tế, lấy bơm tiêm vô trùng đâm nhanh mũi kim vào tĩnh mạch, hút đủ lượng máu cần: 8 - 10 ml

- + Tháo dây ga rô, căng da, rút nhanh kim ra. Cầm máu vết chích.
- Thay đầu kim lấy thuốc với kích thước 18, bơm máu vào chai PLUS Aerobic/F Culture Vial, lắc nhẹ chai cho máu khỏi đông

- Ghi tên, tuổi, khoa phòng, số giường, ngày giờ cấy lên chai cấy máu

#### **b. Chuẩn bị bệnh phẩm dịch não tủy**

- Khi tiếp nhận bệnh phẩm, lắc đều bệnh phẩm
- Dùng bơm tiêm hút 3ml - 5 ml bơm vào chai cấy, lắc nhẹ chai cho bệnh phẩm trộn đều môi trường

- Ghi tên, tuổi, khoa phòng, số giường, ngày giờ cấy lên chai cấy.

#### **c. Vận chuyển và bảo quản bệnh phẩm cấy máu, dịch não tủy**

- Chuyển ngay chai cấy về khoa xét nghiệm
- Ghi tên, tuổi, khoa phòng, số giường, chẩn đoán, mã bệnh phẩm, ngày cấy vào sổ cấy. Ghi mã bệnh phẩm lên chai cấy

#### **4.4.2. Hóa chất, vật tư tiêu hao**

- Dụng cụ lấy bệnh phẩm máu: bơm tiêm, kim tiêm, bông vô khuẩn, cồn sát khuẩn, dây ga rô

- Găng tay

- Bút viết đánh dấu

- Chai cấy máu Bactec™ Plus Aerobic/F Culture Vial.

#### **4.4.3. Các bước tiến hành**

- Cho chai vào máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- Nếu thời gian chờ đợi trước khi cho chai vào máy cấy quá 2 tiếng, có thể bảo quản 20h ở 35°C hoặc 48h ở 20 – 25°C. Không bảo quản trong tủ lạnh.

- Sau một thời gian nhất định máy sẽ báo dương hoặc âm khi trên màn hình hiển thị dấu “+” hoặc “-” tại vị trí chai máu tương ứng tối đa trong 5 ngày không kể ngày cấy. Với chai báo dương:

- + Lấy chai báo dương, quét mã vạch, nhấn “OK”, lấy chai máu ra khỏi máy cấy máu.

- + Cấy ra đĩa thạch máu và chocolate bằng bơm tiêm 1ml vô trùng và phết lam nhuộm Gram soi thấy cầu khuẩn Gram âm.

- + Tiệt trùng que cấy trên ngọn lửa đèn cồn, để nguội rồi cấy phân vùng (4 vùng).

- + Tiệt trùng que cấy.

- + Cho đĩa thạch vào tủ ấm 37°C, CO<sub>2</sub> 5 % (một số vi khuẩn không cần CO<sub>2</sub> 5% cần dựa vào kết quả nhuộm Gram cần để định hướng), 18 - 24h sau nhận định vi khuẩn (nếu có) và theo dõi từ 24h - 48h.

#### **4.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm**

##### **4.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm**

Sau 5 ngày nuôi cấy máy báo âm tính, trả kết quả: “Không có vi khuẩn gây bệnh”. Nếu máy báo dương tính, sẽ thực hiện như nhận định kết quả bên dưới để khẳng định về hình thể khuẩn lạc.

#### 4.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

Thực hiện nuôi cấy mẫu khi máy báo dương tính trên đĩa thạch và nhuộm Gram:

- Nhận định khuẩn lạc dạng S, tròn, nhẵn, kích thước khoảng 0,5 – 1,0 mm, không màu hoặc xám nhạt

- Nhận định hình thể, cách sắp xếp của vi khuẩn, tính chất bắt màu.

Từ đó, đề định hướng cho định danh và làm kháng sinh đồ vi khuẩn.

#### 4.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán viêm màng não mô cầu bằng phương pháp nuôi cấy tự động.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

### 5. Phương pháp định danh vi khuẩn *N. meningitidis* dựa vào tính chất sinh vật hóa học.

Đây là một phương pháp định danh dựa vào tính chất sinh vật hóa học bằng bộ API NH hoặc tương đương.

#### 5.1. Phạm vi áp dụng

Xét nghiệm nhằm định danh vi khuẩn *N. meningitidis* bằng bộ API NH dựa vào tính chất sinh vật hóa học (SVHH) từ khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy.

#### 5.2. Nguyên lý:

Thanh API NH gồm có 10 ống nhỏ chứa các môi trường đông khô, những ống nhỏ này có khả năng làm 12 test định danh (các phản ứng enzym hay sự lên men của đường) cũng như phát hiện penicillinase. Trong quá trình ủ, chất chuyển hoá tạo ra sự thay đổi màu một cách tự động hoặc biểu hiện khi thêm thuốc thử.

#### 5.3. An toàn sinh học

Thực hiện theo yêu cầu mục 3.3, Phần III, nhóm bệnh này.

#### 5.4. Thực hiện xét nghiệm

##### 5.4.1. Mẫu

- Khuẩn lạc thuần đã được nuôi cấy từ 18 giờ đến 24 giờ, có dạng S, tròn, nhẵn, kích thước khoảng 0,5 – 1,0 mm, không màu hoặc xám nhạt.

Yêu cầu: Khuẩn lạc thuần nhất, không bị nhiễm nhiều loại khuẩn lạc. Khuẩn lạc không đạt yêu cầu là không thuần nhất.

- Chuẩn bị vi khuẩn

Trước khi sử dụng API NH, chuẩn bị hỗn dịch tương đương 4McFarland vì việc này rất cần thiết để thực hiện nuôi cấy. Sử dụng môi trường trong điều kiện giàu CO<sub>2</sub> từ 18 – 24 giờ ở 36°C ± 2°C (để enzym của vi khuẩn biểu hiện tốt nhất trên thanh API NH) để nuôi cấy.

##### 5.4.2. Hóa chất, vật tư tiêu hao

- Thuốc thử

+ Độ đục chuẩn Mcfarland

- + Dầu parafin
- Môi trường API NaCl 0.85% (2ml)
- + 1 ống chất thử JAMES
- + 1 ống chất thử ZYM B
- + Thanh định danh API NH

### 5.4.3. Các bước tiến hành

- Chuẩn bị thanh API NH
- + Chuẩn bị một hộp ủ ( khay và nắp)
- + Ghi số bệnh phẩm trên vành có hình thon dài của khay. (Không ghi trên số nắp vì có thể bị xoá mất trong suốt quá trình tiến hành xét nghiệm).
- + Lấy thanh ra khỏi bao gói riêng của nó.
- + Đặt thanh vào tủ ủ.
- + Loại bỏ những chất làm khô.
- + Mở một ống môi trường API NaCl 0.85% ( 2ml)
- Dùng tăm-bông, lấy vài khuẩn lạc thuần được nuôi cấy và chuẩn bị hỗn hợp dịch với độ đục tương đương 4 McFarland, đảm bảo hỗn dịch đã được trộn kỹ. Yêu cầu sử dụng khuẩn lạc mới cấy (trước 18 – 24 giờ). Hỗn hợp dịch này phải được sử dụng ngay lập tức sau khi pha chế.
- Đưa hỗn hợp dịch đã pha chủng vi khuẩn
- Đưa hỗn dịch vi khuẩn vào mỗi tuýp, tránh tạo bọt khí
- Cho hỗn dịch vào các giếng của 7 giếng đầu tiên (từ test PEN đến test URE): khoảng 50µl,
- Cho vào giếng và phần hình chén của 3 giếng cuối [LIP/ProA], [PAL/GGT], [βGAL/IND] : khoảng 150 µl tránh làm mất khum của chất lỏng bị lồi
- Phủ 7 test đầu tiên (từ PEN đến URE) với dầu parafine (những test được gạch chân)

**Lưu ý:** Chất lượng của mỗi lần cho vào là rất quan trọng: Các tuýp đầy tràn hay không đủ có thể gây ra kết quả dương tính giả hoặc âm tính giả.

- Đóng hộp ủ; Ủ trong vòng 2 – 2.5 giờ ở nhiệt độ 36°C ± 2°C trong môi trường hiếu khí.

## 5.5. Phân giải kết quả xét nghiệm

### 5.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

**a) Việc đọc kết quả được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất:**

- Sau giai đoạn ủ, đọc kết quả dựa vào Bảng đọc trong Bản hướng dẫn này.
- + Đọc các phản ứng tự phát và ghi kết quả là dương tính (+) hoặc âm tính (-) trên bảng kết quả

**Cảnh báo:** 3 giếng cuối có cùng chức năng và có thể thực hiện 2 phản ứng trên cùng một giếng:

- Giếng 8. [LIP] (phản ứng tự phát)/ [ProA] (phản ứng sau khi thêm thuốc thử)



- Giếng 9. PAL (phản ứng tự phát)/ GGT (phản ứng sau khi thêm thuốc thử)

- Giếng 10. BGAL (phản ứng tự phát)/ IND (phản ứng sau khi thêm thuốc thử)

+ Các kết quả của các phản ứng LIP, PAL và BGAL phải được ghi trước khi thêm thuốc thử

+ Thêm một giọt thuốc thử ZYM B vào các giếng 8 và 9: LIP/ProA, PAL/GGT,

- Thêm một giọt thuốc thử JAMES vào giếng 10: BGAL/IND

#### **b) Đọc tất cả các phản ứng**

- Đọc trong vòng 3 phút theo như bảng đọc kết quả trong bảng hướng dẫn và ghi kết quả vào bảng kết quả

- Trước định danh các ô trong thanh định danh có màu tương ứng trong cột “Âm tính”, nếu kết quả dương tính sẽ cho màu tương ứng giống trong cột “Dương tính” của bảng bên dưới.

**Bảng 2. Bảng đọc kết quả**

Xét nghiệm	Thành phần	Số lượng	Phản ứng/ Enzym	Kết quả	
				Âm tính	Dương tính
1) <u>PEN</u>	Potassium benzylpenicillin	1/36	PENcilliasse	Xanh da trời (không có penicillina se)	Màu vàng, vàng xanh, (có penicilliasse)
2) <u>GLU</u> 3) <u>FRU</u> 4) <u>MAL</u> 5) <u>SAC</u>	D-glucose D-fructose D-maltose D-saccharose (sucrose)	0.5 0.1 0.1 0.5	axít hóa (GLUcose) axít hóa (FRUtose) axít hóa (MALtose) axít hóa (SACcharose)	đỏ đỏ – vàng	Vàng da cam
6) <u>ODC</u>	L-orithine	0.552	Orithine Decarboxylase	vàng – xanh lá cây lam xám	xanh da trời
7) <u>URE</u>	Ure	0.41	UREase	Vàng	vàng – tím
8a) <u>LIP</u>	5-bromo-3-indoxyl-caprate	0.033	LIPase	không màu xám nhạt	xanh da trời (+ kết tủa)
9a) <u>PAL</u>	4-nitrophenyl	0.038	ALkaline Phosphatase	không màu	vàng

Xét nghiệm	Thành phần	Số lượng	Phản ứng/ Enzym	Kết quả	
				Âm tính	Dương tính
	-phosphate 2CHA			xám nhạt	
10a) [ <u>βGAL</u> ]	4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.04	βD-galactosidase	không màu	Vàng
8b) [ <u>ProA</u> ]	proline-4-methoxy-β-naphthylamide	0.056	Proline Arylamidase nếu LIP là dương tính, ProA luôn là âm tính	vàng vàng nhạt (nâu nếu LIP +)	<u>ZYM B/ 3 phút</u> Da cam
9b) [ <u>GGT</u> ]	γ-glutamyl-4-methoxy-β-naphthylamide	0.049	Gamma Glutamyl Transferase	vàng vàng nhạt (vàng-da cam nếu PAL +)	<u>ZYM B/ 3 phút</u> da cam
10b) [ <u>IND</u> ]	L-tryptophane	0.036	INDole	không màu	<u>ZYM B/ 3 phút</u> hồng

- Nếu phản ứng [LIP] là dương tính (màu xanh), phản ứng [ProA] là âm tính dù thuốc thử ZYM B được thêm vào hoặc không.

- Nếu trong vòng 2 giờ ủ, một số phản ứng (lên men, pencillinase) vẫn nghi ngờ, ủ lại các thanh thêm 2 giờ nữa và đọc lại kết quả phản ứng (xét nghiệm enzym không cần đọc lại trong trường hợp này).

### 5.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

- Phân tích kết quả

Việc định danh được thực hiện bằng việc mô tả tóm lược bằng số như sau: Trên giếng kết quả, các test được chia làm các nhóm có 3 giếng, và một trong các giá trị là 1,2 hoặc 4 được đưa ra cho mỗi giếng. Bằng việc cộng các giá trị tương ứng với các giếng cho phản ứng dương tính trong mỗi nhóm, ta có một dãy số gồm 4 số.

**Cảnh báo:** không tập hợp các test đầu tiên (Pencillinase). Nhóm đầu tiên chứa các test GLU – FRU – MAL.

- Kết quả được xác nhận sau khi nhập mã nhận dạng vào Với phần mềm định danh **apiweb**<sup>TM</sup>, thiết bị ATB<sup>TM</sup> hoặc **mini API**

- Đánh vào 4 số tìm được bằng bàn phím trên màn hình.

### 5.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả định danh viêm màng não mô cầu bằng phương pháp sinh vật hóa học.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## 6. Định danh vi khuẩn *N. meningitidis* bằng máy định danh tự động (ví dụ máy Malditof)

### 6.1. Phạm vi áp dụng :

Xét nghiệm nhằm định danh vi khuẩn *N. meningitidis* bằng máy định danh tự động Malditof từ khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy.

### 6.2. Nguyên lý :

Mỗi loài sinh vật đều có thành phần các protein trong ribosome rất đặc trưng cho riêng loài đó, gọi là dấu ấn phân tử (molecula fingerprint) của loài. Máy MALDI Biotyper sử dụng công nghệ MALDI-TOF MS để gây ion hóa và thu nhận các protein / peptide từ mẫu cần định danh, sau đó biểu diễn chúng ở dạng một phổ khối lượng (hay còn gọi là khối phổ - mass spectrum). Bằng cách so sánh khối phổ thu được với các phổ tham chiếu có sẵn trong thư viện dữ liệu, máy MALDI Biotyper sẽ cho kết quả định danh chính xác loài vi sinh vật.

### 6.3. An toàn sinh học

Thực hiện theo yêu cầu mục 3.3, Phần III, nhóm bệnh này.

### 6.4. Thực hiện xét nghiệm

#### 6.4.1. Mẫu

- Khuẩn lạc thuần đã được nuôi cấy từ 18 giờ đến 24 giờ, có dạng S, tròn, nhẵn, kích thước khoảng 0,5 – 1,0 mm, không màu hoặc xám nhạt.

- Yêu cầu: Khuẩn lạc thuần, riêng rẽ, không bị nhiễm nhiều loại khuẩn lạc. Khuẩn lạc không đạt yêu cầu là không riêng rẽ và bị nhiễm từ 2 đến 3 loại khuẩn lạc.

- Chuẩn bị mẫu: Mẫu khuẩn lạc nên là mẫu tươi.

#### 6.4.2. Thuốc thử, hóa chất, vật tư tiêu hao

- Bruker HCCA matrix portioned

- Bruker Bacterial Test Standard (BTS)

- Axit formic tinh khiết 99-100%

- Acetonitrile tinh khiết 99-100%

- Axit trifluoroacetic (TFA) tinh khiết 99-100%

- Ethanol tinh khiết 99-100%

- Nước siêu tinh khiết

#### Chuẩn bị hóa chất

- “Stock Solution” – Dung môi dùng cho HCCA Matrix và Bruker Test Standard (BTS)

+ Lấy 1 tuýp Eppendorf và cho vào đó 475  $\mu$ L nước siêu tinh khiết, 500  $\mu$ L Acetonitrile (ACN) 100% và 25  $\mu$ L Trifluoroacetic acid 100% (TFA).

+ Trộn đều bằng vortex. Như vậy ta có được 1 ml hỗn hợp, gọi là “stock solution”. Stock solution có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- HCCA Matrix

+ Lấy 1 tuýp HCCA Matrix, cho vào đó 250  $\mu$ L stock solution.

+ Vortex ở nhiệt độ phòng cho đến khi thu được dung dịch trong suốt (tất cả tinh thể HCCA đều được hòa tan, nồng độ cuối là 10 mg HCCA/ml).

- Bruker Test Standard (BTS)

+ Lấy 1 tuýp BTS, cho vào đó 50  $\mu$ L stock solution. Thực hiện pipetting ít nhất 20 lần ở nhiệt độ phòng, tránh tạo bọt.

+ Để ở nhiệt độ phòng 5 phút, sau đó lại pipetting ít nhất 20 lần, tránh tạo bọt.

+ Nếu dung dịch vẫn còn đục, thực hiện quay ly tâm 2 phút với tốc độ 13000 rpm ở nhiệt độ phòng.

+ Dung dịch BTS sau khi pha xong chia nhỏ ra làm nhiều tuýp (chẳng hạn chia làm 10 tuýp, mỗi tuýp 5  $\mu$ L) và bảo quản ở nhiệt độ dưới  $-18^{\circ}\text{C}$ . Nếu thao tác chuẩn bị tốt, dung dịch BTS có thể bền trong 5 tháng ở điều kiện bảo quản đã nêu ở trên.

#### 6.4.3. Các bước tiến hành

- Bước 1: Phết khuẩn lạc thuần lên một vị trí (spot) của đĩa MALDI target. Lưu ý chỉ phết một lượng nhỏ khuẩn lạc (vừa đủ nhìn thấy), có thể sử dụng tăm tiết trùng (toothpicks) để phết. Để mẫu khô ở nhiệt độ phòng.

- Bước 2: Cho 1  $\mu$ L dung dịch HCCA Matrix lên mỗi vị trí mẫu và để khô ở nhiệt độ phòng, sau đó có thể đưa đĩa MALDI Target vào máy MALDI Biotyper để thực hiện định danh.

### 6.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

#### 6.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

**Bảng 3. Phiên giải kết quả**

Giá trị	Phiên giải
2.000 ... 3.000	Độ tin cậy cao
1.700... 1.999	Độ tin cậy trung bình
0.000...1.699	Không tin cậy

- Kết quả mức xanh lục ứng với giá trị  $\geq 2$ : Độ tin cậy cao, có thể chính xác đến cấp độ loài (species)

- Kết quả mức vàng ứng với giá trị  $\geq 1.7$  và  $\leq 1.999$  : Độ tin cậy trung bình, có kết quả chính xác cấp độ chi (genus).

- Kết quả mức đỏ ứng với giá trị  $< 1.7$  : Không có kết quả định danh hoặc kết quả không tin cậy.

#### 6.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

Dựa vào phần mềm của máy Malditof để xác nhận kết quả.

#### 6.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả định danh vi khuẩn viêm màng não mô cầu bằng phương pháp định danh tự động.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## **7. Định danh vi khuẩn *N. meningitidis* bằng máy định danh tự động (ví dụ Vitek 2 Compac)**

### **7.1. Phạm vi áp dụng:**

Xét nghiệm nhằm hướng đến định danh vi khuẩn *N. meningitidis* bằng máy định danh tự động Vitek 2 Compac từ khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy.

### **7.2. Nguyên lý :**

Dùng phương pháp đo màu để nhận biết các tính chất sinh vật hoá học của vi sinh vật thông qua sự thay đổi màu của các giếng môi trường có sẵn trong các định danh.

Máy sẽ giám sát sự phát triển và hoạt tính của vi sinh vật bên trong các giếng của thẻ xét nghiệm. Bộ phận quang học sử dụng ánh sáng nhìn thấy để đánh giá trực tiếp sự phát triển của vi sinh vật. Bộ phận quang học này dựa trên đọc ánh sáng ban đầu của mỗi giếng trước khi bắt đầu có sự phát triển. Máy đọc 15 phút/ lần để đo sự phát triển của vi khuẩn trong mỗi giếng. Phần mềm so sánh kết quả thu được với cơ sở dữ liệu để đưa ra kết quả.

### **7.3. An toàn sinh học**

Thực hiện theo yêu cầu tại mục 3.3, phần III, nhóm bệnh này.

### **7.4. Thực hiện xét nghiệm**

#### **7.4.1. Mẫu**

- Khuẩn lạc thuần đã được nuôi cấy từ 18 giờ đến 24 giờ, có dạng S, tròn, nhẵn, kích thước khoảng 0,5 – 1,0 mm, không màu hoặc xám nhạt.

- Yêu cầu: Khuẩn lạc thuần riêng rẽ, không bị nhiễm nhiều loại khuẩn lạc. Khuẩn lạc không đạt yêu cầu là không riêng rẽ và bị nhiễm từ 2 đến 3 loại khuẩn lạc.

#### **7.4.2. Hóa chất, vật tư tiêu hao**

- Các định danh NH (*Nisseria/Haemophilus*)

- Nước muối vô trùng 0,45%

#### **7.4.3. Các bước tiến hành**

Quy trình định danh bằng máy VITEK 2 - compact theo hướng dẫn của nhà sản xuất gồm các bước chính như sau:

- Chuẩn bị Worksheet cho cassette (ghi các thông tin cần biết về bệnh nhân như tên, tuổi, lab ID...): Vào “Enter cassette manager” - chọn “Setup tests post entry” - chọn Print - chọn “Blank cassette worksheet” - nhấn OK để in

- Chuẩn bị các: Lấy các ra khỏi tủ lạnh và để ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút

- Chuẩn bị ống làm định danh: Lấy 3 ml nước muối 0,45 % từ Dispenser và pha mẫu: Dùng que cấy lấy chủng cần định danh từ khuẩn lạc thuần nhất, pha vào ống định danh trên. Kiểm tra độ đục vi khuẩn bằng máy

đo độ đục từ 2,7 đến 3,3 Mac Farland (McF). Ống này được cắm thứ tự vào cassette. Đầu hút card định danh được cắm vào các ống tương ứng

- Nếu máy đã sẵn sàng (màn hình hiện Start Fill và OK): Mở cửa buồng hút, cho cassette vào rồi đóng cửa buồng hút và nhấn Start Fill

- Khi đèn báo nhấp nháy (sau khoảng 2 phút), màn hình báo “Transfer”, mở cửa buồng hút lấy cassette ra và mở cửa buồng vận hành rồi cho cassette chứa các vào (bước này không được quá 10 phút). Đóng cả hai cửa. Chú ý: không được mở cửa trước khi mở buồng hút để tránh làm hỏng tất cả các card đang chạy trong máy

- Nhập thông tin cassette: Nếu bệnh phẩm chỉ làm định danh bơi đen 1 hàng (GN), rồi vào Define Isolate để nhập thông tin: ID lab, số vi khuẩn. Vào Bench name để chọn tên người thực hiện. Nhấn Save cassette data để xác nhận;

- Nhập thông tin bệnh nhân: Vào “View and Maintain Patient Information” (Biểu tượng hình người). Vào Add patient để thêm bệnh nhân. Nhập các thông tin có dấu \* đỏ (bắt buộc). Nhấn Save để xác nhận.

## 7.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm

### 7.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm

Dữ liệu sẽ được tự động ghi vào phần mềm trên máy tính. Phần mềm phân tích kết quả và xác định vi sinh vật dựa và các phản ứng sinh hóa.

**Bảng 4. Kết quả định danh**

Mức độ tin cậy	Các sự lựa chọn	Xác suất	Khuyến cáo
Xuất sắc	1	96 % – 99%	
Rất tốt	1	93% – 95%	
Tốt	1	89 % – 82%	
Chấp nhận được	1	85% – 88%	
Thấp	2 hoặc 3	Tổng phần trăm = 100	2 hoặc 3 loài có cùng cơ sở giống nhau. Phân biệt bằng các test phụ.
Không xác định	0		

### 7.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm

Nhận định bằng phần mềm của máy định danh tự động Vitek 2 Compact để xác nhận kết quả.

### 7.5.3. Ghi chép và báo cáo

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả định danh viêm màng não mô cầu bằng phương pháp định danh tự động.

- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.

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

- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## **8. Xét nghiệm realtime PCR**

### **8.1. Phạm vi áp dụng:**

Xét nghiệm xác định chẩn đoán viêm não mô cầu bằng cách phát hiện bản sao ADN của vi khuẩn *N. meningitidis* từ mẫu bệnh phẩm.

### **8.2. Nguyên lý:**

Trong kỹ thuật này gen (DNA) của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* được khuếch đại dựa trên trình tự DNA khuôn mẫu của vi khuẩn *Neisseria meningitidis* hiện diện trong bệnh phẩm qua sự lặp lại của tiến trình gồm 3 giai đoạn: biến tính (denaturation), gắn môi (annealing) và tổng hợp kéo dài (extension) với sự trợ giúp của DNA polymerase chịu nhiệt, primers và deoxynucleotide triphosphates (dNTPs).

Mẫu dò là một đoạn oligonucleotit (vd: Taqman<sup>®</sup> probe) được gắn với một chất nhuộm phát tín hiệu huỳnh quang ở đầu 5' (R), đầu kia thì được gắn với thuốc nhuộm dập tắt huỳnh quang (Q). Khi mẫu dò còn nguyên vẹn, Q có vai trò nhận năng lượng phát ra từ R (hiệu ứng chuyển năng lượng huỳnh quang). Nếu có trình tự đích, mẫu dò và môi sẽ gắn vào khuôn, quá trình tổng hợp bắt đầu. Trong quá trình tổng hợp, enzym Taq DNA polymerase với hoạt tính exonuclease sẽ cắt các nucleotid của mẫu dò từ đầu 5', giải phóng R khỏi Q, làm tăng tín hiệu huỳnh quang của R. Càng nhiều sản phẩm tạo thành thì càng nhiều mẫu dò bị phân cắt và tín hiệu của R phát ra càng nhiều. Mắt đọc tín hiệu huỳnh quang của máy sẽ thu tín hiệu R, xử lý bằng phần mềm và đưa ra kết quả cuối cùng.

### **8.3. An toàn sinh học**

Thực hiện theo yêu cầu tại mục 3.3, phần III, nhóm bệnh này.

### **8.4. Thực hiện xét nghiệm**

#### **8.4.1. Mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm là dịch não tủy, dịch ngoáy họng hoặc khuẩn lạc đã được nuôi cấy từ bệnh phẩm của bệnh nhân viêm não mô cầu.

#### **a. Tách chiết DNA từ mẫu**

Chứng âm là nước cất hai lần (NFW). Tiến hành tách chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.

- Bước 1: Hút 200 µl dung dịch lysis AL vào ống eppendorf 1,5 ml đã có sẵn 20 µl carrier ARN và 20 µl proteinase K.

- Bước 2: Cho 200 µl bệnh phẩm vào ống eppendorf có chứa hỗn hợp Buffer AL - carrier RNA - proteinase K. Trộn đều bằng cách votex trong 15 giây. Chú ý: Để đảm bảo cho quá trình ly giải đạt hiệu quả tối đa, quá trình votex phải được làm cẩn thận.

- Bước 3: Ủ ở nhiệt độ 56°C trong 10 phút.

- Bước 4: Ly tâm nhẹ để đẩy những dung dịch bám ở nắp ống xuống phía dưới.

- Bước 5: Bổ sung thêm 200 µl ethanol (96 – 100%), trộn đều bằng votex trong 15 giây. Sau khi trộn, ly tâm nhẹ để đẩy lượng dung dịch nhỏ bám ở nắp ống xuống phía dưới.

- Bước 6: Cân thận chuyển toàn bộ dung dịch ở bước 5 lên cột lọc (đã có ống hứng loại 2 ml ở dưới). Đóng nắp và ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ ống hứng có chứa dịch, chuyển cột lọc sang một ống hứng mới.

- Bước 7: Mở nắp cột lọc cẩn thận, rửa bằng 500 µl Wash buffer AW1. Đóng nắp và ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ ống hứng có chứa dịch, chuyển cột lọc sang một ống hứng mới.

- Bước 8: Mở nắp cột lọc cẩn thận, rửa lại bằng 500 µl Wash buffer AW2. Đóng nắp và ly tâm ở 14000 vòng/phút trong 3 phút. Loại bỏ ống hứng có chứa dịch, chuyển cột lọc sang một ống hứng mới.

- Bước 9: Đặt cột lọc vào một ống hứng mới, ly tâm ở 14000 vòng/phút trong 1 phút.

- Bước 10: Đặt cột lọc vào một ống eppendorf 1,5 ml mới và loại bỏ ống hứng có chứa dịch. Mở nắp cột lọc cẩn thận và cho 50 µl Elution buffer AE. Đóng nắp và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm ở 8000 vòng/ phút trong 1 phút.

#### **8.4.2. Sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao**

##### **a. Sinh phẩm hóa chất**

- Vật tư

+ Bút đánh dấu

+ Ống eppendorf loại 1.5-2ml đã khử trùng và không chứa RNase

+ Dầu côn loại 2-50ul, 20- 200 µl và 1000 µl có màng lọc

+ Ống tuýp định danh loại 5 ml;

+ Tube Eppendorf ;

+ Khăn lau Kimwipes; Tăm tiệt trùng;

+ Găng (không bột), khẩu trang, mũ trùm 1 lần

- Kit tách chiết DNA của Qiagene (hoặc tương đương)

- Một số loại hóa chất dùng trong xét nghiệm:

+ dNTPs 10µM

+ MgCL<sub>2</sub> 25µM

+ 10µM PCR buffer (Dung dịch đệm)

+ HotStart Taq DNA polymerase

##### **b. Tiến hành pha**

- Số lượng ống PCR cần cho một đợt chạy realtime-PCR theo công thức sau:

Số lượng ống = Số bệnh phẩm +2

- Làm tan đá ống PCR master mix, hút 12,5 µl cho mỗi phản ứng PCR vào ống eppendorf 1,5 ml. Sau đó trộn các thành phần realtime PCR theo bảng sau:



**Bảng 5. Thành phần pha sinh phẩm**

Thành phần phản ứng	Nồng độ ( $\mu\text{M}$ )	Thể tích ( $\mu\text{l}$ )
PCR Master Mix	10	12,5
MgCl <sub>2</sub>	25	2
DMSO	10	1
Môi xuôi	10	1
Môi ngược	10	1
Mẫu dò	10	0,25
H <sub>2</sub> O		2,25
Tổng		20

- Đặt các ống PCR đã chứa Mix vào dụng cụ làm lạnh và để dụng cụ này trong điều kiện 2 - 4°C trong lúc tiến hành tách chiết DNA.

- Đóng chặt nắp ống PCR.

### c. Chuẩn bị cặp môi realtime RT-PCR

**Bảng 6: Bộ môi cho phản ứng RT-PCR**

Tên	Trình tự (5'-3')
Môi xuôi	GCTGCGGTAGGTGGTTAA
Môi ngược	TTGTCGCGGATTTGCAACTA
Mẫu dò	FAM-CATTGCCACGTGTCAGCTGCACAT-TAMRA

### 8.4.3 Tiến hành chạy phản ứng realtime PCR

Mỗi lần chạy PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng dương để đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR được đảm bảo chất lượng; Chứng âm để kiểm soát quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm.

- Chuyển 5  $\mu\text{l}$  sản phẩm tách chiết DNA cùng các chứng âm và chứng dương vào các ống PCR tương ứng.

- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm DNA tách chiết.

- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài theo chu trình nhiệt sau:

**Bảng 7. Đặt chương trình phản ứng PCR**

Chương trình	Nhiệt độ [°C]	Thời gian [hh:mm:ss]	Chu kỳ
Biến tính	95	00:15:00	1
Khuếch đại	95	00:00:30	45
	60	00:00:30	
	72	00:00:30	

## **8.5. Phiên giải kết quả xét nghiệm**

### **8.5.1. Đọc kết quả xét nghiệm**

- Kết quả chỉ đọc được khi:
  - + Chứng âm: không có tín hiệu huỳnh quang.
  - + Chứng âm tách chiết: không có tín hiệu huỳnh quang.
  - + Chứng dương: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận nhỏ hơn chu kỳ thứ 40 của phản ứng.
- + Mẫu dương tính: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận nhỏ hơn chu kỳ thứ 40 của phản ứng.
  - Nếu trong trường hợp phương pháp realtime RT - PCR vẫn cho kết quả không rõ thì mẫu bệnh phẩm này sẽ được lặp lại từ bước tách chiết mẫu và có thể chạy song song hai phương pháp RT-PCR và realtime PCR; hoặc phòng xét nghiệm có thể yêu cầu lấy lại bệnh phẩm và xét nghiệm theo thường quy của phòng từ bước nhận bệnh phẩm.

### **8.5.2. Nhận định kết quả xét nghiệm**

Phát hiện đoạn DNA đặc hiệu của vi khuẩn *Neisseria meningitidis*

Kết quả được chấp nhận khi:

- Chứng dương: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận.
- Chứng âm: không có tín hiệu huỳnh quang.
- Dương tính: sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước bằng kích thước chứng dương.
- Âm tính: là sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.

### **8.5.3. Ghi chép và báo cáo**

- Hoàn thành biểu mẫu kết quả chẩn đoán viêm màng não mô cầu bằng phương pháp rPCR.
- Nhập kết quả xét nghiệm vào sổ theo dõi.
- Nhập kết quả vào máy tính và chuyển vào hồ sơ tổng hợp.
- Người kiểm tra sẽ kiểm tra lại kết quả trước khi báo cáo người phụ trách PXN.

## **IV. Tài liệu tham khảo**

1. Bộ môn Vi sinh, Đại học Y Hà Nội (2007), *Giáo trình thực tập Vi sinh y học*.
  2. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh học, 2013, Quyết định 26/QĐ-BYT.
  3. Hướng dẫn sử dụng máy định danh và làm kháng sinh đồ tự động Vitek 2 – compact, 2007.
  4. Hướng dẫn sử dụng máy định danh Malditof, 2014.
  5. Hướng dẫn sử dụng bộ kit Qiagene.
  6. *Kỹ thuật xét nghiệm Vi sinh lâm sàng*, 2006, Nhà xuất bản Y học.
- Tài liệu tham khảo về lấy bệnh phẩm và an toàn Sinh học của WHO, CDC và Bộ Y Tế.
7. *Vi sinh Y học*, 2011, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân.

8. *Vi sinh vật Y học*, 2007, Nhà xuất bản Y học.
9. Bactec Model 9050/9120 operation manual text book.
10. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edition, William & Wilkins.
11. *Diagnostic Microbiology*, 4th Edition, Washington, Philadelphia. WHO, *Laboratory for the Diagnosis of Meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae*, WHO manual, 2nd edition.
12. *Manual of Clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> Edition, Washington DC – Patrick Murray.
13. Nadine G. Roupael and David S. Stephens (2012), *Neisseria meningitidis: Biology, Microbiology, and Epidemiology*, Methods Molecular Biology; pp 799: 1–20.
14. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty - Second Informational Supplement (2012)*, Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility testing standards M02 - A11 and M07 - A9.
15. VITEK® 2 Systems Product Information 410791 (09/2010), bioMérieux;
16. Wellcogen™ N. meningitidis ACY W135 manual.