

BỆNH VIỆN ĐA KHOA SỐ 2 TỈNH LÀO CAI



**HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT
CHUYÊN NGÀNH SINH HỌC PHÂN TỬ – TẬP 1**

*(Ban hành kèm theo Quyết định số /QĐ-BVĐK2 ngày tháng 11 năm 2025
của Giám đốc Bệnh viện Đa khoa số 2 tỉnh Lào Cai)*

Lào Cai, năm 2025

Hội đồng thẩm định

BSCKII. Nguyễn Việt Hải	Phó Giám đốc bệnh viện
ThS. Lâm Thị Hậu	Phó Giám đốc Trung tâm Xét nghiệm
ThS. Nguyễn Thế Linh	Phó trưởng phòng QLCL
DSCKI. Nguyễn Thị Mỹ Nương	Phó trưởng phòng KHTH
DSCKI. Hoàng Anh Ninh	GNV. Phó trưởng phòng ĐT&CDT
Đỗ Dương Quân	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh
BSCKI. Hồ Thị Phi Nga	Giám đốc Trung tâm Xét nghiệm
BSCKI. Trần Thị Hào	Phụ trách bộ phận HHTM - TTXN
ThS. Nguyễn Thị Ngọc Bích	KTV Trưởng Trung tâm Xét nghiệm

Biên soạn

BSCKI. Nguyễn Huy Hà	Phụ trách bộ phận Miễn dịch - TTXN
ThS. Nguyễn Thị Ngọc Bích	KTV Trưởng TTXN
CN. Nguyễn Ngọc Minh Huế	Nhân viên TTXN
CN. Nguyễn Hồng Minh	Nhân viên TTXN
CN. Chu Thị Bích Nguyệt	Nhân viên TTXN

LỜI NÓI ĐẦU

Trong công tác khám và điều trị bệnh, xét nghiệm y học giữ vai trò đặc biệt quan trọng, cung cấp những thông tin chính xác, kịp thời giúp bác sĩ chẩn đoán, theo dõi và đánh giá hiệu quả điều trị. Trong bối cảnh chăm sóc sức khỏe ngày càng hiện đại và yêu cầu chất lượng ngày càng cao, hoạt động xét nghiệm không chỉ dừng lại ở việc thực hiện kỹ thuật mà còn đòi hỏi sự chuẩn hóa quy trình, đảm bảo an toàn, kiểm soát chất lượng và tuân thủ các tiêu chuẩn nghề nghiệp.

Nhằm nâng cao hiệu quả công tác xét nghiệm, đảm bảo kết quả có độ tin cậy cao, Bệnh viện Đa khoa số 2 tỉnh Lào Cai xây dựng và ban hành “Tập tài liệu hướng dẫn quy trình chuyên ngành Sinh học phân tử – Tập 1” gồm 20 quy trình chuyên ngành Sinh học phân tử. Tài liệu bao gồm các quy trình kỹ thuật cơ bản và chuyên sâu, giúp cán bộ kỹ thuật viên, bác sĩ xét nghiệm thực hiện công việc một cách thống nhất, khoa học và an toàn.

Tài liệu không chỉ phục vụ cho công tác chuyên môn mà còn là cơ sở tham khảo hữu ích trong đào tạo, nghiên cứu, và kiểm soát chất lượng xét nghiệm. Thông qua việc áp dụng thống nhất các quy trình, bệnh viện hướng tới mục tiêu nâng cao chất lượng xét nghiệm, giảm thiểu sai sót và đảm bảo an toàn tối đa cho người bệnh.

Tập thể biên soạn mong nhận được những ý kiến đóng góp của các đồng nghiệp, chuyên gia và cán bộ y tế để tài liệu ngày càng hoàn thiện hơn, phục vụ thiết thực cho công tác khám chữa bệnh và quản lý chất lượng xét nghiệm trong toàn ngành.

Tập thể biên soạn

NGUYÊN TẮC ÁP DỤNG HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT

1. Quy trình kỹ thuật được xây dựng và ban hành theo từng chuyên ngành, bao gồm mục đích, ý nghĩa, các bước của quy trình xét nghiệm theo trình tự từ khi bắt đầu lấy mẫu đến khi kết thúc thực hiện kỹ thuật.
2. Quy trình kỹ thuật này được áp dụng tại Trung tâm xét nghiệm - Bệnh viện Đa khoa số 2 tỉnh Lào Cai.
3. Quy định về thời gian, nhân lực thực hiện kỹ thuật (chức danh chuyên môn nghề nghiệp), thuốc, thiết bị y tế... quy trình ban hành dựa trên tính phổ biến, thường quy thực hiện tại bệnh viện Đa khoa số 2 tỉnh Lào Cai. Trong thực tế triển khai, căn cứ diễn biến lâm sàng, tình trạng người bệnh, điều kiện thực tế của bệnh viện, việc triển khai kỹ thuật có thể cần huy động thêm nhân lực, bổ sung thuốc, thiết bị y tế..., Lãnh đạo bệnh viện ban hành các quy trình kỹ thuật trong đó quy định về thời gian và các quy định khác phù hợp để áp dụng tại đơn vị.
4. Thời gian thực hiện kỹ thuật: Là tổng thời gian tiêu tốn để thực hiện kỹ thuật bao gồm cả chuẩn bị (lấy mẫu bệnh phẩm, chuẩn bị dụng cụ, hóa chất...), cài đặt máy, kiểm tra chất lượng (nội kiểm, sinh phẩm), rửa máy, thực hiện kỹ thuật, xử lý sai sót, vệ sinh, bảo dưỡng máy, dụng cụ.
5. Tài liệu chuyên môn Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Sinh học phân tử được xây dựng và ban hành cho các kỹ thuật có trong Phụ lục số 02 Thông tư số 23/2024/TT-BYT đồng thời có tên (trùng hoặc tên khác nhưng bản chất kỹ thuật và quy trình kỹ thuật thực hiện giống nhau) trong Phụ lục số 01 Thông tư số 23/2024/TT-BYT. Quy trình kỹ thuật của kỹ thuật có tên trong cột số 3 được áp dụng đối với các kỹ thuật có tên trong cột số 5 của Phụ lục về Danh mục kỹ thuật về Sinh học phân tử được ban hành kèm theo Quyết định này.

PHỤ LỤC 1
DANH MỤC KỸ THUẬT CHƯƠNG 28 VI SINH

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2024/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2024/TT-BYT (cột 5)	Tên quy trình của TTXN hiện tại
9	96	Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.37 0	Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp Real - time PCR đa môi	
10	97	Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường ruột Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.37 1	Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường ruột Real - time PCR đa môi	
8	98	Vi sinh vật nhiễm khuẩn não - màng não Real-time PCR đa tác nhân (cho trên 3 tác nhân, tùy thuộc vào số lượng tác nhân cần xác định)	BS_24.37 2	Vi sinh vật nhiễm khuẩn não - màng não Real - time PCR đa môi	
3	125	MTB (Mycobacterium tuberculosis) PCR hệ thống tự động	24.31	Mycobacterium tuberculosis PCR hệ thống tự động	
4	127	MTB (Mycobacterium tuberculosis) Real-time PCR	24.32	Mycobacterium tuberculosis Real-time PCR	

1	275	SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật Real-time RT PCR	BS_24.40 5	Xét nghiệm SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật Realtime RT- PCR	
12	305	HBV đo tải lượng Real-time PCR	24.136	HBV đo tải lượng Real-time PCR	
13	306	HBV đo tải lượng hệ thống tự động	24.137	HBV đo tải lượng hệ thống tự động	
7	310	HPV genotype Real-time PCR	24.24	HPV genotype Real-time PCR	
14	323	HCV đo tải lượng Real-time PCR	24.151	HCV đo tải lượng Real-time PCR	
15	324	HCV đo tải lượng hệ thống tự động	24.152	HCV đo tải lượng hệ thống tự động	
5	349	HIV đo tải lượng Real-time PCR	24.179	HIV đo tải lượng Real-time PCR	
11	350	HIV đo tải lượng hệ thống tự động	24.18	HIV đo tải lượng hệ thống tự động	
16	400	Coronavirus Real-time PCR	24.235	Coronavirus Real-time PCR	
6	405	HPV Real-time PCR	24.239	HPV Real-time PCR	

PHỤ LỤC 2
DANH MỤC KỸ THUẬT
CHƯƠNG 27. DI TRUYỀN - SINH HỌC PHÂN TỬ

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2024/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2024/TT-BYT (cột 5)	Tên quy trình của TTXN hiện tại
2	95	Xét nghiệm xác định HLA (một trong số các locus: A, B, C, DR, DQ hoặc DP) bằng kỹ thuật PCR-SSP	22.360; 22.361; 22.362; 22.363; 22.364; 22.634	Định typ HLA-DQ độ phân giải cao (bằng kỹ thuật PCR-SSP)	quy trình xét nghiệm định typ HLA-A độ phân giải cao (bằng kỹ thuật pcr-ssp)

PHỤ LỤC 3
DANH MỤC KỸ THUẬT CHƯƠNG 25 GIẢI PHẪU BỆNH

STT trong QTKT (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2024/TT-BYT (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2024/TT-BYT (cột 5)	Tên quy trình của TTXN hiện tại
17	95			Xét nghiệm đột biến gen BRAF	Xét nghiệm đột biến gen BRAF
18	93			Xét nghiệm đột biến gen EGFR	Xét nghiệm đột biến gen EGFR
19	64			Xét nghiệm đột biến gen KRAS	Xét nghiệm đột biến gen KRAS
20	96			Xét nghiệm đột biến gen NRAS	Xét nghiệm đột biến gen NRAS

MỤC LỤC

1. QUY TRÌNH SARS-COV-2 BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME RT-PCR	1
2. QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỊNH TYP HLA-A ĐỘ PHÂN GIẢI CAO (BẰNG KỸ THUẬT PCR-SSP)	8
3. QUY TRÌNH MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PCR HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG	14
4. QUY TRÌNH MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS REAL-TIME PCR ...	22
5. QUY TRÌNH HIV ĐO TẢI LƯỢNG REALTIMEPCR	30
6. QUY TRÌNH HPV REAL-TIME PCR.....	37
7. QUY TRÌNH HPV HPV GENOTYPE REALTIME PCR.....	44
8. QUY TRÌNH VI SINH VẬT NHIỄM KHUẨN NÃO - MÀNG NÃO REAL- TIME PCR ĐA TÁC NHÂN	52
9. QUY TRÌNH VI SINH VẬT NHIỄM KHUẨN HÔ HẤP REAL-TIME PCR ĐA TÁC NHÂN.....	59
10. QUY TRÌNH VI SINH VẬT NHIỄM KHUẨN KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT REAL-TIME PCR ĐA TÁC NHÂN	66
11. QUY TRÌNH HIV ĐO TẢI LƯỢNG HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG.....	73
12. QUY TRÌNH HBV ĐO TẢI LƯỢNG REAL-TIME PCR.....	81
13. QUY TRÌNH HBV ĐO TẢI LƯỢNG HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG	88
14. QUY TRÌNH HCV ĐO TẢI LƯỢNG REAL-TIME PCR.....	98
15. QUY TRÌNH HCV ĐO TẢI LƯỢNG HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG	106
16. QUY TRÌNH CORONAVIRUS REAL-TIME PCR.....	114
17. QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN BRAF	121
18. QUY TRÌNH QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN EGFR	131
19. QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN KRAS.....	140
20. QUY TRÌNH QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN NRAS.....	151

1. QUY TRÌNH SARS-COV-2 BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME RT-PCR

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.04

1. MỤC ĐÍCH

Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR, từ đó tránh được tối đa sai số có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại Trung tâm Xét nghiệm, Bệnh viện đa khoa số 2 tỉnh Lào cai.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Không áp dụng

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- PCR: Polemerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi polymerase)
- DNA: Axit deoxyribonucleic
- ATSH: an toàn sinh học

NGUYÊN LÝ

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Các mẫu chuẩn được chạy cùng với mẫu bệnh phẩm và khi cường độ tín hiệu huỳnh quang của mẫu vượt qua đường tín hiệu huỳnh quang nền của phản ứng thì mẫu được xem là dương tính và ta lấy thời điểm vượt qua đó (biểu hiện qua giá trị chu kỳ ngưỡng - Ct) để so sánh với đường cong chuẩn (chứng chuẩn) được xây dựng từ chu kỳ ngưỡng của các mẫu chuẩn đã biết trước nồng độ từ đó suy ra số lượng DNA mẫu đưa vào phản ứng.

6. TRANG THIẾT BỊ

- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2° – 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm sinh học phân tử" mã số XN.QTQL.8.3.5.
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong

phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm).

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2. (không áp dụng với những mẫu bệnh phẩm do TTXN lấy trực tiếp)

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml

- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ, KTV, hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm

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

- Thu nhận và xử lý mẫu: Lưu ý cần tiên xử lý bệnh phẩm với các mẫu nhậy
- Tách chiết RNA: Tách vhiets bằng tay hoặc tự động, Thêm vào mỗi mẫu 5 μ l nội kiểm A khi tách chiết

- Chạy One-step Real-time RT-PCR:

- + Bật thiết bị chính và máy tính.
- + Khởi động phần mềm real-time PCR
- + Chuẩn bị Mastermix:

Rã đông bộ kit thử, trộn nhẹ nhàng và ly tâm nhanh bằng máy spindown.

Thành phần mỗi loiaj tuân theo bảng hướng dẫn sau:

Số phản ứng = số mẫu + số chứng + 1

Chuẩn bị ống PCR premix theo hướng dẫn của nhà sản xuất và hút 20 μ l hỗn hợp vào mỗi ống phản ứng PCR (nếu trong bước tách đã cho nội kiểm A, còn nếu trong khi tách chưa có nội kiểm A thì tổng thể tích là 20.5 μ l đã bao gồm cả nội kiểm)

Thể tích	1	3	4	5	6	7	8	9	10
Reaction Solution	14	42	56	70	84	98	112	126	140
Enzyme Rtas	6	18	24	30	36	42	48	54	60
IC	0.5	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Tổng	20.5								

Lưu ý: Hỗn hợp phản ứng PCR sau khi trộn đều vững ở 8°C trong 3 giờ

Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh trước khi phân phối vào các ống phản ứng.

Chia 20µl MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.

Thêm 5µl sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống.

Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.

Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.

Cài đặt chu trình nhiệt trên máy RT-PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Cài đặt sơ đồ mẫu

Bắt đầu chạy chương trình, lưu file vào mục thích hợp.

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

10.1.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

10.1.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong người thực hiện cập nhập kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

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

- Trong quá trình thực hiện xét nghiệm:

+ Tín hiệu IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm

Phản ứng PCR bị ức chế: kiểm tra phương pháp tách chiết theo khuyến cáo.

Điều kiện bảo quản sinh phẩm không đúng theo hướng dẫn: kiểm tra điều kiện bảo quản.

Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn: kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử: Thêm IC trong quá trình tách chiết.

+ Tín hiệu mẫu yếu ($C_t > 36$): lặp lại phản ứng.

+ Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính: Nhiễm trong quá trình tách chiết, kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ: khử trùng bề mặt và dụng cụ với dung dịch khử nhiễm, chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết, lặp lại bước tách chiết với bộ thuốc thử mới và thực hiện lại PCR với bộ thuốc thử mới.

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

Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR: kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

Chứng dương bị hỏng: có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn, kiểm tra lại điều kiện bảo quản.

- Sau khi thực hiện kỹ thuật:

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

+ Tạm dừng trả kết quả nếu kết quả nội kiểm không đạt, tìm nguyên nhân và khắc phục khi nội kiểm không đạt.

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

2. QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỊNH TYP HLA-A ĐỘ PHÂN GIẢI CAO (BẰNG KỸ THUẬT PCR-SSP)

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.11

1. MỤC ĐÍCH

Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm xét nghiệm hiểu và tuân thủ Quy trình xét nghiệm định typ HLA-A độ phân giải cao (bằng kỹ thuật PCR-SSP) từ đó tránh được tối đa sai số có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại Trung tâm Xét nghiệm, Bệnh viện đa khoa số 2 tỉnh Lào cai
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Quy trình xét nghiệm định typ HLA độ phân giải cao bằng kỹ thuật PCR là phương pháp sinh học phân tử sử dụng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để khuếch đại các đoạn DNA cụ thể từ gen HLA-A và sau đó sử dụng các kỹ thuật khác như PCR-SSP (PCR – Sequence Specific Primers), PCR –SSO (PCR – Sequence Specific Oligonucleotide) hoặc giải trình tự để xác định chính xác các biến thể (alleles) của gen này.

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

BN	Bệnh nhân
BP	Bệnh phẩm
NV	Nhân viên
QC	Quality control (huyết thanh kiểm tra)

QLCL	Quản lý chất lượng
QLKT	Quản lý kỹ thuật

5. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật SSP dựa trên ứng dụng kỹ thuật PCR. Với việc tổng hợp nên các đoạn ADN đặc trưng từ 1 đoạn ADN khuôn bằng các cặp mồi đặc hiệu. Thông qua phần mềm phân tích để xác định nhóm HLA cho từng cá thể.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

Máy ly tâm lạnh cho eppendoff. - Máy PCR.

Máy điện di gel agarrose. - Máy votex.

Hệ thống soi gel bằng đèn cực tím.

Hệ thống chụp ảnh gel sau điện di.

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm "Quy trình nội kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.3
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 5 – 6 giờ (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm).

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Trang phục bảo hộ.
- Găng tay, khẩu trang.

Pipetman các loại: 1000ml, 200ml, 20ml.

Pipet nhựa dùng 1 lần.

Ống endoff 1,5ml.

Đầu côn có phin lọc loại 1000ml, 200ml, 20ml.

Đầu côn không có phin lọc loại 200ml.

Pipetman các loại: 1000ml, 200ml, 20ml.

Pipet nhựa dùng 1 lần.

Ống endoff 1,5ml.

Đầu côn có phin lọc loại 1000ml, 200ml, 20ml.

Đầu côn không có phin lọc loại 200ml.

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

- Khởi động máy, kiểm tra hóa chất, thuốc thử, vật tư, nước.
- Kiểm tra hệ thống Lab trên máy tính kết nối với máy xét nghiệm.
- Đối chiếu thông tin bệnh nhân, mã code trước khi thực hiện xét nghiệm.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi nhận được ly tâm 3500 vòng/phút x trong 5 phút.

- Kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn sử dụng máy PCR ,máy điện di gel agarrose,máy votex tự động của từng nhà sản xuất và quy trình chạy mẫu của từng PXN.

Lấy ống D-mix, phiên xét nghiệm, mẫu ADN ra khỏi tủ bảo quản, để tan đông ở nhiệt độ phòng.

Lấy ống enzym Taq ra khỏi tủ âm và giữ trên đá cho đến khi sử dụng. - Dùng pipet chuyển 120ml ADN và 7ml taq vào ống D-mix.

Dùng máy votex để trộn đều hỗn hợp trên, sau đó ly tâm nhẹ để kéo toàn bộ hóa chất bám trên nắp ống xuống đáy.

Chia vào từng giếng của phiên 10ml hỗn hợp trên.

Dùng miếng giấy dán, dán kín toàn bộ phiên.

Đặt phiên vào máy PCR.

Chọn chương trình chạy PCR cho xét nghiệm HLA.

Lấy phiên ra khỏi máy PCR sau khi chương trình chạy kết thúc.

Điện di toàn bộ sản phẩm sau PCR trên thạch agarrose 2%.

Điện di 10 phút ở hiệu điện thế 100V.

Sau khi điện di, nhuộm bản gel với ethidium boromid.

Rửa lại bản gel và xem kết quả điện di trên máy soi gel.

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Nhận định và diễn giải kết quả

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

- Đánh giá theo tiêu chuẩn nhà sản xuất

+ Chạy kiểm tra chứng 1 và chứng 2 trên tất cả các điện cực dùng để chạy xét nghiệm.

+ Giá trị chứng đạt được phải nằm trong khoảng giới hạn xác định.

- Đánh giá theo tiêu chuẩn phòng xét nghiệm

+ Chứng nội kiểm, ngoại kiểm(nếu có) đạt theo yêu cầu quản lý chất lượng của phòng xét nghiệm.

- Kết quả và báo cáo

+ Máy sẽ tự động tính toán giá trị ngưỡng dựa trên giá trị hiệu chuẩn của lô thuốc thử. Kết quả của mẫu bệnh phẩm sẽ được thông báo là có phản ứng hoặc không có phản ứng cùng với chỉ số ngưỡng (COI) của mẫu.

- Kết quả được diễn giải như sau:

+ Nếu một băng DNA trong mẫu trùng với một băng tương ứng trong băng đối chiếu của một loại kháng nguyên HLA-A nhất định, điều đó có nghĩa là người bệnh có kháng nguyên đó.

+ Ví dụ, nếu một băng trong mẫu chạy điện di trùng với dải băng của kháng nguyên HLA-A*02:01, thì kết quả định typ là HLA-A*02:01.

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại khoa mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý: Những sai sót và xử trí

11.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

11.2 Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

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

11.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

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

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.
- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn
7	XN.QTQL.2.3	Quy trình quản lý hồ sơ

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Thông tư số 01/2013/TT-BYT ngày 11/01/2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế, “Hướng dẫn thực hiện quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh”.
- Quyết định 2678/QĐ-BYT Ngày 22/08/2025 Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về dị ứng-Miễn dịch lâm sàng-Tập 1.

3. QUY TRÌNH MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PCR HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.14

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình *Mycobacterium tuberculosis* PCR hệ thống tự động từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Phát hiện gen đặc trưng của *Mycobacterium tuberculosis* trong mẫu bệnh phẩm đờm, các loại dịch sinh học, mủ, phân và mảnh sinh thiết lấy từ người bằng hệ thống máy PCR tự động.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang. Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp mồi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'- phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên tục
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố

5. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Sự hiện diện của Mycobacterium tuberculosis được biểu hiện bởi sự phát triển huỳnh quang của chất phát huỳnh quang FAM. Chứng nội chuẩn được bổ sung vào mẫu bệnh phẩm giúp kiểm soát các yếu tố gây ức chế phản ứng PCR. Tín hiệu chứng nội được phát hiện nhờ chất phát huỳnh quang HEX.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.

- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vô lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (5 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

- Bệnh phẩm nhầy, nhớt nhiều như đờm, dịch phế quản, dịch khớp cần được xử lý để thuần nhất mẫu bệnh phẩm trước khi tách chiết.
- Những bệnh phẩm không bị nhầy nhớt như dịch não tủy, nước tiểu, có thể sử dụng để tách chiết DNA luôn.
- Nếu chưa tách chiết ngay, bảo quản mẫu ở -20°C (phải trộn đều trước khi tách chiết)

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

Tách chiết DNA và thực hiện phản ứng real-time PCR trên hệ thống máy tự động.

- Bật nguồn điện máy vi tính của hệ thống, bật máy tách chiết và máy PCR.
- Vận hành theo hướng dẫn sử dụng máy.
- Chuẩn bị mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm để tách chiết
- Các hóa chất, sinh phẩm, bệnh phẩm được lưu giữ trong tủ âm nên được rã đông ở nhiệt độ phòng ít nhất 10 phút trước khi sử dụng.
- Sử dụng ống chứa mẫu bệnh phẩm Sample Loading Tube-DNA IPC để tách chiết trên hệ thống máy tách tự động.
- Đánh số mẫu bệnh phẩm, mẫu NC đặt ở vị trí đầu tiên của mẻ tách, mẫu PC đặt ở vị trí thứ 2 của mẻ tách, các vị trí tiếp theo để mẫu bệnh phẩm.
- Thêm 400 μ L Buffer... vào ống mẫu ghi mẫu chứng NC và PC, thêm 5 μ L DEPC DW vào ống ghi mẫu chứng NC, 5 μ L PC vào ống ghi mẫu chứng PC

(tổng lượng mẫu dùng để tách chiết NC và PC là 405 U μ L)

- Thêm 400 μ L bệnh phẩm vào các ống đánh số mẫu bệnh phẩm tương ứng. 1001
- Chuẩn bị ống premix:
 - + Chuẩn bị số lượng ống premix tương ứng với số lượng ống chứng và ống mẫu bệnh phẩm.
 - + Đưa các mẫu đối chứng, mẫu bệnh phẩm đã chuẩn bị ở trên, các ống premix vào máy tách.
- Chuẩn bị các vật tư, hóa chất tách chiết theo như hướng dẫn sử dụng máy.
- Mở phần mềm ExiStationManager trên máy vi tính.
- Trên thanh công cụ Prep hiển thị ba ô cửa tương ứng với 3 máy tách chiết.
- Nhập các số liệu tương ứng với từng dòng trên từng máy tách.
- Nhấn nút ► và làm theo hướng dẫn để bắt đầu quá trình tách chiết. Chú ý thời gian tách chiết để có thể đưa sản phẩm vào chạy realtime PCR sớm nhất (thời gian tối đa sau khi tách xong phải cho vào máy chạy PCR là 120 phút)
- Đưa sản phẩm máy tách chiết ra khỏi hệ thống tách chiết, dùng dụng cụ đã cho của hãng cung cấp lấy cẩn thận ống premix ra khỏi khay cơ sở.
- Dùng kéo cắt Optical Film với kích thước phù hợp và dùng Optical Film Applicator để gắn chặt lên các ống nghiệm premix.
 - Chú ý: Để tránh lây nhiễm chéo và cho kết quả sai lệch, hãy gắn thật cẩn thận.- Để hòa tan các hạt premix, và khuấy trộn premix với mẫu DNA, hãy dùng máy trộn, lắc chuyên dụng và thực hiện 20 chu kỳ, tốc độ 2500 rpm, theo chu kỳ: spin-down 5 giây/lắc mạnh: 20 giây.
 - Chú ý: PCR premix có sẵn các thuốc thử PCR được đông khô. Khuấy trộn premix không hiệu quả có thể cho kết quả PCR không chính xác, vì thế hãy khuấy trộn premix thật kỹ trước khi dùng.
- Khi máy trộn, lắc đang làm việc, hãy khởi động phần mềm chạy máy Real-time PCR.
- Khi máy trộn, lắc kết thúc, chuyển các ống phản ứng vào máy Real-time PCR ngay.
- Nhấn nút Standby Power Switch. Đèn LED sẽ đỏ.
- Nhấn giữ nút Power 2 giây, sau khi máy tự kiểm tra, đèn LED sẽ lên màu xanh sau một tiếng “bíp” ngắn.
- Nhấn giữ nút Door 2 giây, cửa mở, đưa các ống phản ứng vào các vị trí định sẵn.
- Tiếp tục làm theo hướng dẫn sử dụng máy.

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

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

- Xem xét kết quả nội kiểm
- Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu
- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

Mẫu chứng	Màu FAM	Màu HEX	Diễn giải
Chứng dương	+	±	Có giá trị
Chứng âm	-	+	Có giá trị

- Các trường hợp cần kiểm tra lại

Mẫu chứng	Màu FAM	Màu HEX	Diễn giải
Chứng dương	-	+	Cần kiểm tra lại
Chứng âm	+	-	Cần kiểm tra lại

10.2. Đọc kết quả

- Mở chương trình ‘Analysis’ có biểu tượng trên màn hình, để biết chi tiết cách phân tích số liệu, vui lòng xem Hướng dẫn sử dụng máy.
- Chọn File>Open, chọn tiếp file (.ex3), file kết quả được lưu trữ trong thư mục đã định sẵn.
- Rất nhiều tab sẽ hiển thị như dưới đây. ‘MTB Real-Time PCR Kit’ tab được hiển thị như đã xuất hiện lúc đầu
- Tab ‘MTB Real-Time PCR Kit’ sẽ hiển thị giá trị Ct được phân tích và quyết định có hiệu lực ở định dạng spreadsheet.
- Well: Vị trí các giếng đối chứng (PC, IPC) và mẫu trên khối nhiệt 96 giếng.
- Sample ID: NTC, PC và tên mẫu đã đưa vào trong sơ đồ mẫu.
- IPC Result: Hiệu lực IPC tính theo giá trị Ct IPC của từng giếng. Nếu giá trị trong khoảng (cho sẵn) sẽ được gắn cờ ‘Valid’, nếu ngoài khoảng sẽ gắn cờ ‘Invalid’.
- Target Ct: Giá trị Ct MTB từng giếng, nếu xét nghiệm có giá trị, NTC sẽ được gắn cờ ‘Undetermined’ và giá trị Ct PC sẽ ở trong khoản b. Đọc kết quả của mẫu bệnh phẩm

10.3. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý: Những sai sót và xử trí

11.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

11.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

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

+ Phản ứng PCR bị ức chế: => Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.

+ Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản.

+ Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

+ Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử => Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.

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

- Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

+ Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ: => Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.

=> Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.

=> Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

=> Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

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

+ Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR

+ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

+ Chứng dương bị hỏng => Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản

- Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

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

+ Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.

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

- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.

- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.

- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

4. QUY TRÌNH MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS REAL-TIME PCR

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.15

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình Mycobacterium tuberculosis realtime PCR từ đó tránh được tối đa sai số có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Phát hiện gen đặc trưng của phức hợp vi khuẩn Mycobacterium tuberculosis trong mẫu bệnh phẩm đờm, các loại dịch sinh học, mủ, phân và mảnh sinh thiết lấy từ người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

- Định nghĩa: *Mycobacterium tuberculosis*: Vi khuẩn lao
- Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang. Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp mồi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'- phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên tục
- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố

5. NGUYÊN LÝ

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

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy PCR và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm

đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.

- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (5 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

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

- Hộp vận chuyên bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

- Bệnh phẩm nhầy, nhớt nhiều như đờm, dịch phế quản, dịch khớp cần được xử lý để thuần nhất mẫu bệnh phẩm trước khi tách chiết.
- Những bệnh phẩm không bị nhầy nhớt như dịch não tủy, nước tiểu, có thể sử dụng để tách chiết DNA luôn.
- Nếu chưa tách chiết ngay, bảo quản mẫu ở -20°C (phải trộn đều trước khi tách chiết)

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

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

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

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

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

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

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

- Chia 30 μL Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu

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

- Cho vào mỗi ống PCR 10 μL DNA mẫu bệnh phẩm đã tách chiết, 10 μL chứng dương và 10 μL chứng âm. Thể tích cuối cùng là 40 μL .

- Ly tâm nhẹ các ống PCR có chứa MasterMix và sản phẩm DNA tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt theo chương trình sau:
- Màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện *M. tuberculosis*, màu HEX cho chứng nội.

- Chu kỳ nhiệt:

+ 1 chu kỳ: 37°C/2 phút

+ 1 chu kỳ: 95°C/10 phút

+ 45 chu kỳ: 95°C/5 giây

60°C/40 giây - đọc sản phẩm

72°C/20 giây

- Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.

- Cho máy real-time PCR chạy chương trình

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

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

- Xem xét kết quả nội kiểm
- Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu
- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

Mẫu chứng	Màu FAM	Màu HEX	Diễn giải
Chứng dương (CT trong khoảng 15-38)	+	±	Có giá trị
Chứng âm	-	+	Có giá trị

- Các trường hợp cần kiểm tra lại

Mẫu chứng	Màu FAM	Màu HEX	Diễn giải
Chứng dương	-	+	Cần kiểm tra lại
Chứng âm	+	-	Cần kiểm tra lại

10.2. Đọc kết quả

TT	Màu FAM	Màu HEX	Kết quả
1	+	±	Dương tính với <i>M. tuberculosis</i>
2	-	+ (CT<38)	Âm tính với <i>M. tuberculosis</i>
3	-	+ (CT>38)	Không có giá trị
4	-	-	Không có giá trị

10.3. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý: Những sai sót và xử trí

11.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

11.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm
- + Phản ứng PCR bị ức chế: => Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- + Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- + Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- + Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử => Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.
- Tín hiệu của mẫu yếu (Ct > 36): lặp lại xét nghiệm.
- Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:
 - + Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ: => Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - => Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa

các ống.

=> Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

=> Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.

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

+ Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR

+ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.

+ Chứng dương bị hỏng => Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản

11.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

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

+ Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú

6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn
---	--------------	-----------------------------

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.µL
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

5. QUY TRÌNH HIV ĐO TẢI LƯỢNG REALTIMEPCR

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.16

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình HIV đo tải lượng realtime PCR từ đó tránh được tối đa sai số có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Xác định số lượng bản sao của Human Immunodeficiency Virus (HIV) trong mẫu bệnh phẩm máu của bệnh nhân nhiễm HIV bằng kỹ thuật Real-time PCR

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

- Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang.
- Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp môi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'-phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- ARN (Axit Ribonucleic): Thường đóng vai trò trung gian trong phiên mã và

chức năng tế bào, cũng là vật chất di truyền của nhiều loại vi-rút gây bệnh.

- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên tục

- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố

5. NGUYÊN LÝ

Đoạn ARN đặc trưng của HIV được sao chép ngược bằng kỹ thuật RT-PCR và khuếch đại bằng kỹ thuật real-time PCR. Số lượng bản sao của HIV có trong mẫu bệnh phẩm được xác định dựa vào đường đồ thị tuyến tính của các loại chứng chuẩn đã biết trước nồng độ.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy realtime PCR và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.

- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (5 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

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

a, Tách chiết ARN

- Chứng âm NC (Negative Control): dùng nước cất đã được khử trùng. Tiến hành tách chiết chứng âm đồng thời với các bệnh phẩm khác.

- Chứng dương PC (Positive Control): dùng mẫu HIV chuẩn hoặc mẫu HIV dương tính đã xác định. Tách chiết cùng với các mẫu chứng và mẫu bệnh phẩm.

- Thực hiện tách chiết bằng máy tự động hoặc bằng phương pháp thủ công, Thực hiện phản ứng real-time PCR

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

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

- Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng chuẩn (standard) gồm 4 nồng độ để làm căn cứ tính nồng độ HIV trong mẫu và đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết không bị nhiễm và tiến hành đúng.
- Hút Master mix vào từng ống PCR bao gồm cả ống cho bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm. Đặt các ống PCR đã chứa master mix vào dụng cụ làm lạnh hoặc khay đá trong lúc tiến hành tách trộn mẫu.

b, Realtime-PCR

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

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

Chọn chương trình luân nhiệt đã được cài đặt trên máy như sau:

* Chu kỳ nhiệt:

+ 1 chu kỳ: 95 °C/3 phút

+ 45 chu kỳ: 95 °C/20 giây

60 °C/30 giây - đọc sản phẩm

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

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả:

10.1.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản, chứng âm và NTC không có bất kì đường đồ thị huỳnh quang nào xuất hiện dưới đường cơ bản.
- Các mẫu chứng dương phải có đường đồ thị huỳnh quang xuất hiện tương ứng với nồng độ biết trước.
- Xây dựng đường đồ thị tuyến tính của 04 mẫu chứng chuẩn. Tính nồng độ HIV trong một đơn vị thể tích bệnh phẩm dựa vào kết quả đường đồ thị tuyến tính

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết

quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.

- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý: Những sai sót và xử trí

11.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm: Nếu mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu về chất lượng hoặc bảo quản, vận chuyển không đúng cách, phòng xét nghiệm sẽ yêu cầu lấy lại bệnh phẩm. Nếu không lấy lại được bệnh phẩm thì phòng xét nghiệm sẽ vẫn thực hiện và ghi chú về khả năng sai lệch kết quả do chất lượng của mẫu bệnh phẩm không được đảm bảo.

- Máy móc, sinh phẩm: máy móc cần được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ theo quy định. Sinh phẩm được nhập, bảo quản theo đúng quy định và hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu phát hiện các sai sót về bảo trì bảo dưỡng máy móc và bảo quản sinh phẩm thì cần phải dừng xét nghiệm.

11.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tiến hành chạy các chứng đồng thời trong mỗi mẻ chạy

- Trong trường hợp mẫu chứng dương không có đồ thị huỳnh quang, kết quả cần phải loại bỏ và thực hiện lại xét nghiệm.

- Trong trường hợp mẫu chứng dương và chứng âm đều có đồ thị huỳnh quang, kết quả cũng bị loại bỏ và cần thực hiện lại xét nghiệm.

- Trong trường hợp mẫu chứng dương có đồ thị huỳnh quang, mẫu chứng âm không có đồ thị huỳnh quang, kết quả đó sẽ được sử dụng.

11.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo để tránh nhầm lẫn

- Các kết quả chưa rõ ràng cần phải lặp lại xét nghiệm hoặc xin ý kiến chuyên gia. Kết quả của mẫu cần phải được đối chiếu cẩn thận với các thông tin trên phiếu chỉ định để tránh nhầm lẫn

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng

3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

6. QUY TRÌNH HPV REAL-TIME PCR

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.17

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình HPV real-time PCR từ đó tránh được tối đa sai số có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Xác định sự có mặt của Human papillomavirus (HPV) trong mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân nhiễm HPV bằng kỹ thuật Real-time PCR

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang. Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp mồi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'- phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- HPV: Human Papilloma Virus
- ADN (Axit Deoxyribonucleic): Là vật chất di truyền cơ bản của hầu hết vi

sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh

- PCR (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng enzyme chuỗi trùng hợp, dùng nhân bản AND

- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố.

5. NGUYÊN LÝ

Đoạn ADN đặc trưng của HPV được khuếch đại và phát hiện bằng kỹ thuật Real-time PCR sử dụng cặp mồi và probe đặc hiệu. Sự có mặt của HPV DNA được xác định dựa trên đường đồ thị huỳnh quang của phản ứng Real-time PCR

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy realtime PCR và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.

- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (5 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

Ly tâm ống máu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

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

a. Tách chiết ADN

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

b. Thực hiện phản ứng PCR

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

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

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

- Tiến hành tan đá các ống master mix trong kit sinh phẩm sau đó giữ ở nhiệt độ 4°C trên khay đá.

- Chuyển sản phẩm tách chiết ADN cùng các chứng dương và âm vào các ống PCR tương ứng.
- Ly tâm nhanh các ống PCR có chứa Mix và sản phẩm ADN tách chiết.
- Chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt và cài đặt chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

Xem xét kết quả nội kiểm

- Chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM dương tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX đại diện cho chứng nội IC dương tính hoặc âm tính.
- Chứng âm có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu FAM âm tính và đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang màu HEX dương tính
- Thực hiện phân tích kết quả theo hướng dẫn của loại sinh phẩm hóa chất đang sử dụng.
- Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.
- Chứng âm không có đường huỳnh quang nào xuất hiện hoặc xuất hiện đồ thị huỳnh quang dưới đường giới hạn cơ bản.
- Chứng nội tại phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản.
- Đường đồ thị huỳnh quang của mẫu có thể xuất hiện hoặc không xuất hiện trên đường giới hạn, căn cứ vào đó để kết luận kết quả.

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

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

Kết quả có thể âm tính giả trong các trường hợp sau:

- + Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng: heparin

+ Môi trường:

- Sử dụng quá nhiều a-xít hypochlorous trong khử nhiễm phòng thí nghiệm.
- Sử dụng găng có bột talc khi thực hiện xét nghiệm.

Kết quả có thể dương tính giả trong các trường hợp sau:

- + Có sự lây nhiễm chéo giữa các mẫu bệnh phẩm.
- + Lây nhiễm các sản phẩm khuyếch đại từ lần phản ứng trước.

- Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

+ Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.
- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.

- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

7. QUY TRÌNH HPV GENOTYPE REALTIME PCR

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.18

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình HPV genotype giải trình tự gene từ đó tránh được tối đa sai số có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Phát hiện định tính, đồng thời nhiều genotype của HPV (gồm 19 typ nguy cơ cao và 9 typ nguy cơ thấp) trong mẫu bệnh phẩm từ đường sinh dục của người bằng kỹ thuật real-time PCR.

Bao gồm:

- Bộ A: 14 type nguy cơ cao: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.
- Bộ B: 5 type nguy cơ cao: 26, 53, 69, 73, 82 & 9 type nguy cơ thấp: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

- Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang.
- Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp mồi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'-phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng

hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

HPV: Human Papilloma Virus

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

5. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR đa môi cho phép khuếch đại, phát hiện đồng thời các nucleic acid khác nhau của 19 type nguy cơ cao và 9 type nguy cơ thấp và chứng nội (IC). Bộ kit có thể thể hiện nhiều xét nghiệm bằng phương pháp End point-CMTA (End point-Catcher Melting Temperature Analysis) hoặc cyclic-CMTA (cyclic-Catcher Melting Temperature Analysis) dựa trên công nghệ TOCE có thể phát hiện nhiều tác nhân gây bệnh trong cùng một kênh màu huỳnh quang bằng máy real-time PCR. Công nghệ TOCE của xét nghiệm được thiết kế để không bị ảnh hưởng bởi sự biến động trình tự, vì vậy nó đảm bảo giá trị nhiệt độ nóng chảy không thay đổi.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy realtime PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm"

mã số XN.QTQL.8.5.

- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.

- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.

- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.

- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.

- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.

- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.

- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (05 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

Ly tâm ống máu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

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

- Bật thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix
- Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

Số phản ứng = Số mẫu + Số chứng + 1

Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng.

- Chia 15 μ L MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

- Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.

- Thêm 5 μ L sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng HPV28 (PC1, PC2 và PC3) vào mỗi ống MasterMix.

- Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.

- Đặt ống phản ứng vào máy real-time

- Cài đặt sơ đồ mẫu

+ Chọn kênh màu: FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 và Quasar 705.

+ Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương.

Lưu ý: chọn loại đĩa: BR White

- Bắt đầu chạy chương trình. Lưu file dữ liệu vào thư mục thích hợp.

- Bắt đầu quá trình chạy realtime PCR

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

Xem xét kết quả nội kiểm

- Chứng nội (IC) được bổ sung để kiểm soát quá trình tách chiết acid nucleic và phản ứng PCR. Nếu chứng nội dương tính chứng tỏ quá trình tách chiết và phản ứng PCR thành công. Tuy nhiên sự phát hiện chứng nội ở kênh Quasar 670 là không cần thiết nếu kết quả dương tính với tác nhân đích. Hiệu giá cao hoặc yếu tố phân tích khác có thể làm giảm hoặc làm mất tín hiệu IC.

- Chứng dương và chứng âm được bổ sung trong mỗi mẻ chạy để kiểm soát chất lượng sinh phẩm và quá trình chạy mẫu

10.2. Đọc kết quả

a. Xem và in kết quả

- Khi quá trình Real time -PCR kết thúc:

+ Click vào Melt curve tab

+ Chỉ chọn Quasar670 và điều chỉnh đường ngưỡng của đỉnh nóng chảy về 0

+ Chọn Seegene Export và xuất kết quả vào thư mục đích.

- Phân tích kết quả trong Seegene Viewer

+ Mở chương trình Seegene Viewer, chọn Open để mở file đã được lưu trong “MeltStep8”.

+ Chọn loại kit xét nghiệm trong PRODUCT. Lưu ý xác định loại ống khi chọn bộ kit xét nghiệm (dây 8 hoặc đĩa 96).

+ Kiểm tra kết quả ở mỗi vị trí.

b. Diễn giải kết quả

Kết quả dương khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) ≤ 42 . Kết quả âm khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) > 42 hoặc N/A.

Kết quả HPV	Kết quả IC	Diễn giải kết quả
+++//++/+	+++//++/+/-	HPV (+), ghi nhận typ HPV
-	+++//++	Không phát hiện virus -> Âm tính
-	+/-	Không có giá trị -> Kiểm tra lại

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

11.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

11.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật-

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

Phản ứng PCR bị ức chế: => Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.

- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản.

- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

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

11.2.2. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

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

11.2.3. Không có tín hiệu dương của chứng dương:

- Thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR. Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR => Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC, chứng dương trong quy trình.
- Chứng dương bị hỏng => Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản.

11.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.
- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm

2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

8. QUY TRÌNH VI SINH VẬT NHIỄM KHUẨN NÃO - MÀNG NÃO REAL-TIME PCR ĐA TÁC NHÂN

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.19

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình Vi sinh vật nhiễm khuẩn não - màng não Real-time PCR đa tác nhân từ đó tránh được tối đa sai số có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Xác định DNA/RNA đặc trưng của các vi sinh vật gây bệnh trong bệnh phẩm dịch não tủy của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang. Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp mồi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'- phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên

tục

- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố

- STDVKH : Sổ tay dịch vụ khách hàng

- QTQL : Quản lý chất lượng

- XN : Xét nghiệm

- STAT: Sổ tay an toàn

5. NGUYÊN LÝ

Dựa trên nguyên lý của công nghệ và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.

- Hệ thống máy realtime PCR và máy tính có cài đặt phần mềm.

- Tủ lạnh 2°C - 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C

- Tủ an toàn sinh học cấp 2

- Máy vortex

- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.

- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5

- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.

- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.

- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.

- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.

- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vô lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (5 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

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

a. Tách chiết acid nucleic

- 10 μ L IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic như bảng sau. IC có thể được bổ sung vào dung dịch ly giải hoặc bổ sung vào hỗn hợp mẫu bệnh phẩm và dung dịch ly giải.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Chạy real-time One-step RT-PCR
- Bất thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

- Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng. Chia 15 μL MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

+ Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.

+ Thêm 5 μL sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.

+ Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.

+ Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.

+ Cài đặt chu trình nhiệt trên máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

+ Cài đặt sơ đồ mẫu Chọn kênh màu

+ Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương. Lưu ý: chọn loại đĩa: BR W hite

+ Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.

+ Cho máy real-time PCR chạy chương trình

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả:

10.1.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Phân tích kết quả trong phần mềm phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- Thông tin phân tích Kết quả dương khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) ≤ 45 .

- Kết quả âm khi giá trị chu kì ngưỡng là N/A

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.

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

- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý: Những sai sót và xử trí

11.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

11.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm
- + Phản ứng PCR bị ức chế: => Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- + Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- + Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- + Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử => Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.
- Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 36$): lặp lại xét nghiệm.
- Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:
 - + Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ: => Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - => Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - => Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - => Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.
- Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.
 - + Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR
 - + Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
 - + Chứng dương bị hỏng => Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản

11.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

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

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.

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

- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.

- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.

- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

9. QUY TRÌNH VI SINH VẬT NHIỄM KHUẨN HÔ HẤP REAL-TIME PCR ĐA TÁC NHÂN

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.20

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình Vi sinh vật nhiễm khuẩn hô hấp Real-time PCR đa tác nhân từ đó tránh được tối đa sai số có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Xác định DNA/RNA đặc trưng của các vi sinh vật gây bệnh trong bệnh phẩm đường hô hấp của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang. Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp mồi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'- phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên tục

- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố

- STDVKH : Sổ tay dịch vụ khách hàng

- QTQL : Quản lý chất lượng

- XN : Xét nghiệm

- STAT: Sổ tay an toàn

5. NGUYÊN LÝ

Dựa trên nguyên lý của công nghệ và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.

- Hệ thống máy realtime PCR và máy tính có cài đặt phần mềm.

- Tủ lạnh 2°C - 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C

- Tủ an toàn sinh học cấp 2

- Máy vortex

- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.

- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5

- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.

- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.

- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.

- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.

- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay

an toàn" mã số XN.STAT.

- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (5 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

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

a. Tách chiết acid nucleic

- 10 μ L IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic. IC có thể được bổ sung vào dung dịch ly giải hoặc bổ sung vào hỗn hợp mẫu bệnh phẩm và dung dịch ly giải.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Chạy real-time One-step RT-PCR
- Bất thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

- Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng. Chia 15 μL MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

+ Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.

+ Thêm 8 μL sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.

+ Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.

+ Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.

+ Cài đặt chu trình nhiệt trên máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

+ Cài đặt sơ đồ mẫu Chọn kênh màu

+ Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương. Lưu ý: chọn loại đĩa: BR W hite

+ Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.

+ Cho máy real-time PCR chạy chương trình

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

- Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Phân tích kết quả trong phần mềm phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.

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

- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý: Những sai sót và xử trí

11.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh

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

11.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm
- + Phản ứng PCR bị ức chế: => Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- + Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- + Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- + Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử => Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.
- Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 36$): lặp lại xét nghiệm.
- Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:
 - + Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ: => Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - => Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - => Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - => Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.
- Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.
- + Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR
- + Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
- + Chứng dương bị hỏng => Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản

11.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

khắc phục.

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.

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

- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.

- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.

- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

10. QUY TRÌNH VI SINH VẬT NHIỄM KHUẨN KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT REAL-TIME PCR ĐA TÁC NHÂN

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.21

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình Vi sinh vật nhiễm khuẩn đường ruột Real-time PCR đa tác nhân từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Xác định DNA/RNA đặc trưng của các vi sinh vật gây bệnh trong bệnh phẩm phân của người bằng kỹ thuật Real-time PCR.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang. Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp mồi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'- phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- Real-time PCR: Là thuật ngữ chỉ quá trình PCR được theo dõi sản phẩm liên

tục

- An toàn sinh học (ATSH): Là một thuật ngữ dùng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết giúp ngăn chặn và loại trừ nguy cơ phơi nhiễm đối với nhân viên phòng xét nghiệm, cộng đồng và môi trường từ các tác nhân gây bệnh và độc tố

- STDVKH : Sổ tay dịch vụ khách hàng

- QTQL : Quản lý chất lượng

- XN : Xét nghiệm

- STAT: Sổ tay an toàn

5. NGUYÊN LÝ

Dựa trên nguyên lý của công nghệ và nguyên lý RT-PCR một bước, đa môi để khuếch đại và phát hiện nhiều acid nucleic đích từ mẫu bệnh phẩm

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.

- Hệ thống máy realtime PCR và máy tính có cài đặt phần mềm.

- Tủ lạnh 2°C - 8°C

- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C

- Tủ an toàn sinh học cấp 2

- Máy vortex

- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.

- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5

- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.

- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.

- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.

- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.

- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (5 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

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

a. Tách chiết acid nucleic

- 10 μ L IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic. IC có thể được bổ sung vào dung dịch ly giải hoặc bổ sung vào hỗn hợp mẫu bệnh phẩm và dung dịch ly giải.
- Thực hiện tách chiết bằng máy hoặc tách chiết thủ công.

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Chạy real-time One-step RT-PCR
- Bất thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix

Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):

$$\text{Số phản ứng} = \text{Số mẫu} + \text{Số chứng} + 1$$

- Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng. Chia 15 μL MasterMix vào mỗi ống phản ứng.

Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)

+ Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.

+ Thêm 5 μL sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.

+ Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.

+ Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.

+ Cài đặt chu trình nhiệt trên máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

+ Cài đặt sơ đồ mẫu Chọn kênh màu

+ Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương. Lưu ý: chọn loại đĩa: BR W hite

+ Lưu file dữ liệu vào máy tính. Nên chọn lưu ở phân vùng ổ cứng không cài hệ điều hành.

+ Cho máy real-time PCR chạy chương trình

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả:

- Xem xét kết quả nội kiểm

- Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Phân tích kết quả trong phần mềm phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.

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

- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý: Những sai sót và xử trí

11.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh

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

11.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Tín hiệu của IC yếu hoặc không có: lặp lại xét nghiệm
- + Phản ứng PCR bị ức chế: => Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.
- + Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản.
- + Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.
- + Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử => Thêm IC trong quá trình tách chiết DNA/RNA.
- Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 36$): lặp lại xét nghiệm.
- Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:
 - + Nhiễm trong quá trình tách chiết. Kết quả tất cả các mẫu không hợp lệ: => Khử trùng tất cả bề mặt và dụng cụ với sodium hypochlorite và ethanol hoặc thuốc khử DNA đặc trưng.
 - => Chỉ sử dụng tip có đầu lọc trong quá trình tách chiết. Thay đổi đầu tip giữa các ống.
 - => Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.
 - => Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới.
- Không có tín hiệu dương của chứng dương: thực hiện lại một lần nữa phản ứng PCR.
 - + Có thể chương trình khuếch đại không chính xác hoặc các lỗi khác xảy ra trong quá trình khuếch đại PCR
 - + Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC chứng dương trong quy trình.
 - + Chứng dương bị hỏng => Có thể điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn => Kiểm tra điều kiện bảo quản

11.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.

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

- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.

- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.

- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

11. QUY TRÌNH HIV ĐO TẢI LƯỢNG HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.23

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình HIV đo tải lượng hệ thống tự động từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Phát hiện và định lượng HIV RNA trong huyết tương người trên hệ thống máy PCR tự động xử lý mẫu, khuếch đại và phát hiện

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

- Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang.
- Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp môi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'-phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- RNA: Acid ribodeoxyribo nucleic

- ATSH: an toàn sinh học
- HIV: Hepatitis C virus
- cDNA: complementary DNA
- STDVKH : Sổ tay dịch vụ khách hàng
- QTQL : Quản lý chất lượng
- XN : Xét nghiệm
- STAT: Sổ tay an toàn

5. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR, là phản ứng PCR trong đó phân tử RNA được phiên mã ngược tạo cDNA và kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. HIV master mix chứa đoạn dò kép phát hiện đặc hiệu cho các trình tự đích HIV và chứng nội chuẩn RNA-QS (Ribonucleic acid - Quantitation Standard). Các đoạn dò được đánh dấu với các chất phát huỳnh quang đặc hiệu với đích, cho phép phát hiện đồng thời HIV mục tiêu và RNA-QS trong hai kênh đích khác nhau. Với mỗi chu kỳ PCR, số lượng của đoạn dò đã phân tách được tạo ra càng tăng và tín hiệu tích lũy của chất phát huỳnh quang đồng thời tăng. Việc phát hiện và phân biệt real-time các sản phẩm PCR được thực hiện bằng cách đo huỳnh quang của các chất phát huỳnh quang được giải phóng ra tương ứng với HIV và RNA-QS.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư"

mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (5 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng

- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

- Đăng nhập hệ thống
- Nạp mẫu lên hệ thống
- + Nạp giá mẫu thử lên hệ thống
- + Hệ thống tự động chuẩn bị
- + Tạo lệnh xét nghiệm
- Thêm thuốc thử và vật tư tiêu hao theo yêu cầu của hệ thống
- + Nạp đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm
- + Nạp giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng)
- + Nạp các đầu típ xử lý
- + Nạp các đầu típ rửa giải
- + Nạp các đĩa xử lý

- + Nạp các đĩa chất thải lỏng
- + Nạp các đĩa khuếch đại
- + Nạp hộp cassette MGP
- + Thêm chất pha loãng mẫu
- + Thêm thuốc thử ly giải
- + Thêm đệm rửa
- Bắt đầu chạy xét nghiệm bằng cách chọn nút Start processing trên giao diện người sử dụng, tất cả các mẻ chạy sau đó sẽ được tự động bắt đầu nếu không bị hoãn thủ công bởi người sử dụng.
- Kiểm tra và xuất kết quả
- Lấy ra và đậy nắp bất kỳ ống mẫu nào đáp ứng yêu cầu thể tích tối thiểu để sử dụng thêm nếu cần. Vệ sinh thiết bị
- + Lấy giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) đã hết ra khỏi máy
- + Lấy đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm đã hết ra khỏi máy
- + Dọn khay đựng các đĩa khuếch đại
- + Đổ bỏ chất thải lỏng
- + Đổ bỏ chất thải rắn

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

Xem xét kết quả nội kiểm

a. Đánh giá theo yêu cầu của nhà sản xuất

- Hệ thống tự động xác định nồng độ HIV-RNA cho mẫu thử và mẫu chứng với đơn vị là IU/ml.
- Mẻ xét nghiệm hợp lệ nếu không xuất hiện cờ hiệu cho tất cả ba mẫu chứng âm, chứng dương thấp và chứng dương cao.
- Kết quả mẫu chứng âm tính được hiển thị là (-) C.
- Kết quả mẫu chứng dương tính nồng độ thấp và cao được hiển thị là HxV L (+) C và HxV H (+) C.
- Kết quả được tự động gán là không hợp lệ bởi phần mềm khi kết quả của mẫu chứng âm tính hoặc dương tính không đạt.

b. Đánh giá theo yêu cầu phòng xét nghiệm

Đánh giá QC (NC, LPC, HPC) theo hướng dẫn theo dõi QC của phòng xét nghiệm.

10.2. Đọc kết quả

- Đọc kết quả của mẫu chứng trong ứng dụng “Controls- Valid: nếu tất cả kết quả được báo cáo hợp lệ

- Invalid: nếu tất cả kết quả được báo cáo là không hợp lệ

+ Mẫu chứng được hiển thị ‘Invalid’ sẽ xuất hiện cờ hiệu ở cột “Flags”. Thông tin thêm về lý do mẫu chứng được báo cáo là không hợp lệ, bao gồm cả thông tin cờ hiệu được hiển thị trong chế độ xem thông tin chi tiết.

+ Nếu một trong các mẫu chứng dương tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các mẫu chứng dương tính và mẫu thử có liên quan.

+ Nếu mẫu chứng âm tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các chứng và mẫu thử có liên quan.

Đọc kết quả của mẫu bệnh phẩm

- Đơn vị đo: IU/mL/copies/mL

Kết quả	Biện luận
Không phát hiện	Không phát hiện RNA HIV. Báo cáo kết quả là "Không phát hiện HIV"
< Nồng độ tối thiểu	Nồng độ tính nằm dưới Giới hạn định lượng dưới (LLoQ) của xét nghiệm.
> Nồng độ tối đa	Nồng độ tính nằm trên Giới hạn định lượng trên (ULoQ) của xét nghiệm. Báo cáo kết quả là "Phát hiện HIV, cao hơn (Nồng độ tối đa)

10.3. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.

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

- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

- Kết quả mẫu > Nồng độ tối đa là do những mẫu dương tính với HIV được phát hiện với nồng độ nằm trên giới hạn định lượng trên (ULoQ). Nếu muốn thu được kết quả định lượng, phải pha loãng mẫu ban đầu với huyết tương chống đông bằng EDTA hoặc huyết thanh âm tính với HIV, tùy thuộc vào loại mẫu ban đầu, và xét nghiệm nên được thực hiện lại. Nhân kết quả xét nghiệm thu được với hệ số pha loãng.

- Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

- Trong quá trình thực hiện kỹ thuật- Kết quả đo tải lượng HIV bị ảnh hưởng khi nồng độ hemoglobin trong mẫu > 250mg/dL.

- Kết quả có thể âm tính giả trong các trường hợp sau:

+ Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng: heparin

+ Môi trường:

- Sử dụng quá nhiều a-xít hypochlorous trong khử nhiễm phòng thí nghiệm.
- Sử dụng găng có bột talc khi thực hiện xét nghiệm.

- Kết quả có thể dương tính giả trong các trường hợp sau:

+ Có sự lây nhiễm chéo giữa các mẫu bệnh phẩm.

+ Lây nhiễm các sản phẩm khuyếch đại từ lần phản ứng trước.

- Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

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

+ Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm

4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

12. QUY TRÌNH HBV ĐO TẢI LƯỢNG REAL-TIME PCR

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.25

1. MỤC ĐÍCH

Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình HBV đo tải lượng Real-time PCR, từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại Trung tâm Xét nghiệm, Bệnh viện đa khoa số 2 tỉnh Lào cai.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Không áp dụng

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- PCR: Polemerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi polymerase)
- DNA: Axit deoxyribonucleic
- ATSH: an toàn sinh học
- HBV: Hepatitis B virus
- STDVKH : Sổ tay dịch vụ khách hàng
- QTQL : Quản lý chất lượng
- XN : Xét nghiệm
- STAT: Sổ tay an toàn

5. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết

quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Các mẫu chuẩn được chạy cùng với mẫu bệnh phẩm và khi cường độ tín hiệu huỳnh quang của mẫu vượt qua đường tín hiệu huỳnh quang nền của phản ứng thì mẫu được xem là dương tính và ta lấy thời điểm vượt qua đó (biểu hiện qua giá trị chu kỳ ngưỡng - Ct) để so sánh với đường cong chuẩn (chứng chuẩn) được xây dựng từ chu kỳ ngưỡng của các mẫu chuẩn đã biết trước nồng độ từ đó suy ra số lượng DNA mẫu đưa vào phản ứng.

6. TRANG THIẾT BỊ

- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2^o – 8^oC
- Tủ lạnh âm sâu -20^oC
- Tủ lạnh âm sâu -70^oC
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số

XN.QTQL.12.2.

- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2. (không áp dụng với những mẫu bệnh phẩm do TTXN lấy trực tiếp)

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)

- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ, KTV, hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Bàn xét nghiệm

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

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (μ l)	25	50	100	200
Thể tích IS (μ l)	2,5	5	10	20

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

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

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

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

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

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng chuẩn (standard) gồm 4 nồng độ để làm căn cứ tính nồng độ HBV trong mẫu và đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

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

*** Realtime-PCR**

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

- Đánh số dây ống PCR 0,2 ml theo số thứ tự mẫu bệnh phẩm.

- Thêm mẫu axit nucleic của mẫu bệnh nhân hoặc Calibrator/ Control vào các ống PCR riêng lẻ.

- Đóng các ống, ly tâm nhanh (spindown), đặt vào máy Real-time PCR theo sơ đồ vị trí mẫu.

- Chọn màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện HBV, màu HEX cho phát hiện chứng nội.

- Chọn chương trình luân nhiệt đã được cài đặt trên máy.

- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

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

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

10.1.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

TT	Màu FAM	Màu HEX	Diễn giải
Chứng chuẩn	+		Điều kiện chấp nhận của chứng chuẩn định lượng: $E = 90 - 115 \%$; $R2 \geq 0,96 - 1$; Slope = -3,3 - -4; Nhưng tốt nhất là:

			E = 95 - 110 %; R2 ≥ 0,99 - 1; Slope = -3,3 - -3.6
Chứng âm	-	+(CT < 38)	Có giá trị

- Các trường hợp cần kiểm tra lại:

TT	Màu FAM	Màu HEX	Kết quả
Chứng dương	-	+	Cần kiểm tra lại
Chứng âm	+	-	Cần kiểm tra lại

10.1.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

TT	Màu FAM	Màu HEX	Kết quả
1	+	±	Dương tính với HBV
2	-	+	Không phát hiện virus HBV
3	-	+(CT > 38)	Không có giá trị
4	-	-	Không có giá trị

- Với những mẫu dương tính, sử dụng công thức sau để tính nồng độ virus trong mẫu: $IU/ml = (SC \times EV)/IV$

Trong đó: SC (Sample Concentration) = Nồng độ virus trong mẫu (IU/μl)

EV (Elution Volume) = Thể tích mẫu thu sau tách chiết (μl)

IV (Isolation Volume) = Thể tích mẫu dùng để tách chiết (ml)

- Chứng nội chuẩn (IS) được thêm vào mẫu bệnh phẩm trước khi tách chiết để kiểm soát quá trình tách DNA và chạy Real-time PCR. Những mẫu có chứng nội chuẩn không đạt cần phải được kiểm tra lại từ bước tách chiết.

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong người thực hiện cập nhập kết quả vào phần mềm máy tính.

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

- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình

lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.
- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

13. QUY TRÌNH HBV ĐO TẢI LƯỢNG HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.26

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình HBV đo tải lượng hệ thống tự động từ đó tránh được tối đa sai số có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Phát hiện và đo số lượng bản sao của virus viêm gan B trong một đơn vị thể tích huyết thanh hoặc huyết tương của người gồm tất cả 9 genotype trên hệ thống máy PCR xử lý mẫu và khuếch đại, phát hiện tự động hoàn toàn.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

- Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang.
- Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp mồi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'-phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- DNA: Deoxyribonucleic
- ATSH: an toàn sinh học
- HBV: Hepatitis B virus
- STDVKH : Sổ tay dịch vụ khách hàng
- QTQL : Quản lý chất lượng
- XN : Xét nghiệm
- STAT: Sổ tay an toàn

5. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time PCR, là phản ứng PCR trong đó kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Hệ thống máy PCR tự động dùng công nghệ vi hạt từ tính để hỗ trợ việc bắt giữ, rửa, và tách rửa acid nucleic. Acid nucleic tinh sạch thu được sau đó sẽ được kết hợp với thuốc thử khuếch đại/phát hiện HBV và chuyển sang một ống phản ứng. ống này sau đó được chuyển sang một bộ phận khuếch đại/phát hiện để thực hiện khuếch đại PCR, và phát hiện tín hiệu huỳnh quang của HBV theo thời gian thực. Hai nồng độ mẫu chuẩn được xử lý trong suốt quy trình chuẩn bị mẫu và PCR để tạo đường cong hiệu chuẩn. Nồng độ DNA của HBV trong các mẫu xét nghiệm và mẫu chứng sau đó được tính toán từ đường cong hiệu chuẩn đã lưu. Trong mỗi lần xử lý mẫu chứng, một mẫu chứng âm tính, một mẫu chứng dương tính nồng độ thấp, một mẫu chứng dương tính nồng độ cao được xử lý trong suốt quá trình chuẩn bị mẫu và PCR giống như quy trình thực hiện với các mẫu xét nghiệm.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.

- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 180 phút (3 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

Ly tâm ống máu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

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

a. Chuẩn bị hóa chất

Trước khi nạp vào hệ thống máy, cần chuẩn bị hóa chất và nạp hóa chất vào máy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

b. Chuẩn bị mẫu

Trước khi chạy mẫu xét nghiệm:

- Kiểm tra tình trạng mẫu chuẩn và mẫu chứng. Từ màn hình Tạo lệnh, chọn xét nghiệm cần chạy (HBV).

- Hệ thống máy sẽ theo dõi thời gian bảo quản trên hệ thống của các thuốc thử khuếch

đại, mẫu chứng, mẫu chuẩn, và mẫu xét nghiệm trong khi ở trên thiết bị. Hệ thống máy sẽ không cho phép dùng các thuốc thử khuếch đại, mẫu chứng, mẫu chuẩn hoặc xử lý các mẫu xét nghiệm đã quá thời gian tối đa lưu trên hệ thống. Các ống tube lấy mẫu với huyết thanh và huyết tương đã được tách riêng và các ống chuyên mẫu có thể được đặt trên giá mẫu nằm trên hệ thống trong tối đa 4 giờ trước khi xử lý.

- Quy trình pha loãng mẫu (Không bắt buộc):

Các mẫu xét nghiệm có thể được pha loãng thủ công để xét nghiệm trên Hệ thống máy tự động bằng Bộ pha loãng của nhà sản xuất theo bảng bên dưới.

+ Thể tích nhỏ $\geq 140 \mu\text{L}$: 1:2,5

+ 50 đến 139 μL : 1:50

+ Kết quả $> \text{ULOQ} \geq 50 \mu\text{L}$: 1:50

Người vận hành phải chọn hệ số pha loãng trong thẻ Specimen của màn hình tạo lệnh (Create Order) từ phần mềm hệ thống. Hệ thống sẽ dùng hệ số pha loãng được chọn để tự động tính toán và báo cáo kết quả của mẫu xét nghiệm không pha.

LƯU Ý: Sau khi pha loãng, mẫu xét nghiệm phải được nạp vào hệ thống trong vòng 2 giờ.

Nạp ống tube pha loãng đã được dán mã lên giá mẫu.

c. Tách chiết DNA vận hành máy PCR tự động

- Thực hiện bảo trì máy:

+ Kiểm tra trạng thái bảo trì ở mục “Overview > Procedures >

+ Thực hiện bảo trì nếu đến hạn:

- Chọn “Monthly” nếu thực hiện bảo trì hàng tuần.
- Chọn “Weekly” nếu thực hiện bảo trì hàng tuần.
- Chọn “To do” nếu thực hiện bảo trì hàng ngày.-
- Chọn “As Needed” nếu thực hiện bảo trì khi cần thiết.

- Chuẩn bị hóa chất và vật tư tiêu hao:

Lấy hóa chất và vật tư tiêu hao cần thiết. Tất cả hóa chất cần được ổn định ở nhiệt độ phòng trước khi nạp vào máy-

- Bắt đầu mở chạy:

Từ màn hình Create Order (Tạo lệnh), chọn xét nghiệm cần chạy (HBV). Các ống tube mẫu xét nghiệm cần đáp ứng các yêu cầu về thể tích mẫu tối thiểu và việc sử dụng nắp ống tube khi nạp vào Hệ thống. Các ống tube lấy mẫu với

huyết thanh và huyết tương đã được tách riêng và các ống chuyên mẫu có thể được đặt trên giá mẫu nằm trên hệ thống trong tối đa 4 giờ trước khi xử lý.

- Bảo dưỡng cuối ngày: Hoàn tất công việc vệ sinh máy.

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

Xem xét kết quả nội kiểm

a. Hiệu chuẩn xét nghiệm

Khi thực hiện hiệu chuẩn xét nghiệm:

- Các giá trị nồng độ của từng lô có thể tự động được nhập vào Hệ thống thông qua phần mềm sau khi quét mã vạch của ống chứa mẫu chuẩn (HBV CAL A và HBV CAL B) hoặc mẫu chứng (HBV NEG CTRL, HBV LOW POS CTRL, và HBV HIGH POS CTRL).

- Cũng có thể lấy giá trị nồng độ của từng lô từ cổng thông tin khách hàng của hãng sản xuất cung cấp và được nhập vào Hệ thống thông qua thẻ nhớ USB.

- Hệ thống sẽ xử lý 3 mẫu lặp lại từ mỗi ống mẫu chuẩn. Các dữ liệu đầu ra của 2 mẫu chuẩn sẽ được dùng để tạo đường cong hiệu chuẩn (nồng độ HBV theo lô so với chu kỳ ngưỡng [Ct] mà tại đó mức phản ứng của tín hiệu huỳnh quang được phát hiện). Độ dốc và hệ số chặn của đường cong hiệu chuẩn được tính toán và lưu trên thiết bị. Sau khi đường cong hiệu chuẩn của xét nghiệm được chấp nhận và lưu, tất cả các mẫu sau đó sẽ được xét nghiệm mà không cần hiệu chuẩn thêm trừ khi có bất cứ tình huống nào sau đây xảy ra:

+ Sử dụng lô AMP Kit mới.

+ Sử dụng lô Sample Prep Kit 2 hoặc Lysis Solution mới.

+ Đường cong hiệu chuẩn của xét nghiệm đã hết hạn (06 tháng).

b. Phát hiện ức chế

- Một thông số xác thực xét nghiệm đó là chu kỳ ngưỡng [Ct] của mẫu chứng nội bộ (IC) được thiết lập trong quá trình chạy mẫu chuẩn. Một lượng IC phù hợp đã xác định được cho vào từng mẫu xét nghiệm, từng mẫu chuẩn, và mẫu chứng ngay từ lúc bắt đầu chuẩn bị mẫu và tính toán trên hệ thống để chứng minh việc xử lý mẫu đúng quy trình và tính xác thực của xét nghiệm. - Giá trị IC Ct trung vị từ các mẫu chuẩn sẽ thiết lập khoảng xác thực của IC Ct cho các mẫu xét nghiệm và mẫu chứng sau đó. Một mã thông báo (Message Code) được gán cho một mẫu xét nghiệm hoặc mẫu chứng khi giá trị IC Ct của nó nằm ngoài khoảng xác thực của IC Ct. Khi một giá trị IC Ct vượt giới hạn trên của khoảng xác thực IC Ct, là dấu hiệu cho thấy các điều kiện xét nghiệm bất thường đã xảy ra, ví dụ như sự ức chế.

c. Mẫu chứng

- Khuyến cáo xét nghiệm một mẫu chứng âm, chứng dương thấp, và chứng

đương cao, tối thiểu một lần mỗi 48 giờ, để theo dõi hiệu quả của xét nghiệm và hệ thống máy. Phải có được các kết quả hợp lệ cho tất cả các mức mẫu chứng trước khi báo cáo kết quả mẫu xét nghiệm. Các mẫu chứng xét nghiệm cũng được xét nghiệm sau mẫu chuẩn và cần có các kết quả mẫu chứng hợp lệ để thiết lập một đường cong hiệu chuẩn mới.

- Để biết thông tin giải quyết vấn đề: Cờ báo lỗi mẫu sẽ hiển thị khi một kết quả mẫu chứng không hợp lệ. Tất cả các mẫu xét nghiệm đã được xử lý sau khi mẫu chứng không hợp lệ phải được xét nghiệm lại.- Giá trị định lượng chấp nhận được nếu không xuất hiện tín hiệu cờ báo cho cả 3 chứng: chứng âm, chứng dương tính thấp, chứng dương tính cao. Các chứng có giá như sau:

+ Chứng âm: không phát hiện.

+ Chứng dương: nằm trong khoảng cho phép của nhà sản xuất (đặc hiệu với từng lô thuốc thử) và không xuất hiện tín hiệu cờ báo.

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

+ Chứng âm: Nếu chứng âm có tín hiệu cờ báo là invalid thì phải thực hiện lại xét nghiệm cả chứng và toàn bộ lô bệnh phẩm.

+ Chứng dương: Nếu một hoặc cả hai chứng dương xuất hiện cờ báo invalid thì phải làm lại xét nghiệm toàn bộ lô bệnh phẩm.

+ Đánh giá theo yêu cầu phòng xét nghiệm

10.2. Đọc kết quả

- Đọc kết quả của mẫu chứng trong ứng dụng “Controls- Valid: nếu tất cả kết quả được báo cáo hợp lệ

- Invalid: nếu tất cả kết quả được báo cáo là không hợp lệ

+ Mẫu chứng được hiển thị ‘Invalid’ sẽ xuất hiện cờ hiệu ở cột “Flags”. Thông tin thêm về lý do mẫu chứng được báo cáo là không hợp lệ, bao gồm cả thông tin cờ hiệu được hiển thị trong chế độ xem thông tin chi tiết.

+ Nếu một trong các mẫu chứng dương tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các mẫu chứng dương tính và mẫu thử có liên quan.

+ Nếu mẫu chứng âm tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các chứng và mẫu thử có liên quan.

Đọc kết quả của mẫu bệnh phẩm

- Đơn vị đo: IU/mL/copies/mL

Mẫu không pha loãng: hệ thống máy sẽ báo cáo kết quả và diễn giải:

Giá trị trên máy	Trả lời kết quả
Not Detected	Không phát hiện thấy HBV-DNA
< 1,00 IU/ml	< 10 IU/ml
1,00 đến 9,00 Log	nhận những kết quả trong giới hạn này
IU/mL	> 109 IU/ml
Invalid	Không giá trị, chạy lại mẫu bệnh phẩm

- Mẫu pha loãng

+ Đối với các mẫu pha loãng tỉ lệ 1 : 2,5 hoặc 1 : 50, Hệ thống sẽ báo cáo một kết quả định lượng là nồng độ HBV DNA trong các mẫu trước khi pha loãng và cờ DIL cho biết rằng mẫu đã được pha loãng.

+ Đối với các mẫu đã được pha loãng mà máy báo kết quả tín hiệu HBV không được phát hiện: Không báo cáo kết quả và phải được kiểm tra lại với các mẫu chưa pha loãng hoặc từ một mẫu bệnh phẩm mới

+ Mẫu xét nghiệm có tỉ lệ pha loãng 1 : 2,5 Hệ thống báo cáo:

< 1,40 Log IU/mL Phát hiện < LLOQ DIL 1,40 đến 9,40 Log IU/mL

> 9,40 Log IU/mL > ULOQ DIL DIL

+ Mẫu xét nghiệm có tỉ lệ pha loãng 1 : 50 Hệ thống báo cáo

< 2,70 Log IU/mL Phát hiện < LLOQ DIL 2,70 đến 10,70 Log IU/mL

> 10,70 Log IU/mL 4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ > ULOQ DIL DIL

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.

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

- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

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

mẫu không đảm bảo chất lượng.

- Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Kết quả đo tải lượng HBV bị ảnh hưởng khi có các mảnh vụn trong bệnh phẩm huyết thanh và huyết tương (ví dụ: cục máu đông, sợi fibrin)

- Kết quả có thể âm tính giả trong các trường hợp sau:

+ Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng: heparin

+ Môi trường:

- Sử dụng quá nhiều a-xít hypochlorous trong khử nhiễm phòng thí nghiệm.

- Sử dụng găng có bột talc khi thực hiện xét nghiệm.

- Kết quả có thể dương tính giả trong các trường hợp sau:

+ Có sự lây nhiễm chéo giữa các mẫu bệnh phẩm.

+ Lây nhiễm các sản phẩm khuyếch đại từ lần phản ứng trước.

- Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

+ Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú

6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn
---	--------------	-----------------------------

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

14. QUY TRÌNH HCV ĐO TẢI LƯỢNG REAL-TIME PCR

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.2

1. MỤC ĐÍCH

Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình HCV đo tải lượng Real-time PCR, từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại Trung tâm Xét nghiệm, Bệnh viện đa khoa số 2 tỉnh Lào cai .
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Không áp dụng

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- PCR: Polemerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi polymerase)
- RNA: Acid ribodeoxyribo nucleic
- ATSH: an toàn sinh học
- HCV: Hepatitis C virus
- cDNA: complementary DNA
- STDVKH : Sổ tay dịch vụ khách hàng
- QTQL : Quản lý chất lượng
- XN : Xét nghiệm
- STAT: Sổ tay an toàn

NGUYÊN LÝ

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR, là phản ứng PCR trong đó phân tử RNA được phiên mã ngược tạo cDNA và kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. Các mẫu chuẩn được chạy cùng với mẫu bệnh phẩm và khi cường độ tín hiệu huỳnh quang của mẫu vượt qua đường tín hiệu huỳnh quang nền của phản ứng thì mẫu được xem là dương tính và ta lấy thời điểm vượt qua đó (biểu hiện qua giá trị chu kỳ ngưỡng - Ct) để so sánh với đường cong chuẩn (chứng chuẩn) được xây dựng từ chu kỳ ngưỡng của các mẫu chuẩn đã biết trước nồng độ từ đó suy ra số lượng DNA mẫu đưa vào phản ứng.

6. TRANG THIẾT BỊ

- Máy ly tâm lạnh đa năng
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh 2^o – 8^oC
- Tủ lạnh âm sâu -20^oC
- Tủ lạnh âm sâu -70^oC
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 µl đến 1000 µl

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay

an toàn" mã số XN.STAT.

- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.

- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.

- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 300 phút (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2. (không áp dụng với những mẫu bệnh phẩm do TTXN lấy trực tiếp)

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm

- Sinh phẩm chuẩn đoán

- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng

- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh

- Cồn 70%

- Dung dịch nước rửa tay

- Dung dịch khử trùng

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

- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng

- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml/0.15ml/0.2ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml/0.15ml/0.2ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ IKTV I hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm
- Bàn xét nghiệm

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

a. Tách chiết acid nucleic

- Cho chứng nội chuẩn IS (Internal Standard) vào mỗi ống bệnh phẩm trước khi tách chiết theo tỷ lệ trong bảng:

Thể tích mẫu thu (μ l)	25	50	100	200
Thể tích IS (μ l)	2,5	5	10	20

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

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

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

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

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

Chú ý: Một lần chạy Realtime PCR cần tiến hành đồng thời 2 loại chứng bao gồm: Chứng chuẩn (standard) gồm 4 nồng độ để làm căn cứ tính nồng độ HBV trong mẫu và đảm bảo các sinh phẩm và phản ứng PCR đã tiến hành đúng; chứng âm để đảm bảo quá trình tách chiết DNA không bị nhiễm và tiến hành đúng.

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

* Realtime-PCR

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

- Đánh số dây ống PCR theo số thứ tự mẫu bệnh phẩm.

- Thêm mẫu axit nucleic của mẫu bệnh nhân hoặc Calibrator/Control vào các ống PCR riêng lẻ.

- Đóng các ống, ly tâm nhanh (spindown), đặt vào máy Real-time PCR theo sơ đồ vị trí mẫu.

- Chọn màu huỳnh quang: FAM cho phát hiện HBV, màu HEX cho phát hiện chứng nội.

- Chọn chương trình luân nhiệt đã được cài đặt trên máy.

- Cho máy real-time PCR chạy chương trình.

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

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

10.1.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận:

TT	Màu FAM	Màu HEX	Diễn giải
Chứng	+		Điều kiện chấp nhận của chứng chuẩn định

chuẩn			lượng: E = 90 - 115 %; R2≥0,96 - 1; Slope = -3,3 - -4; Nhưng tốt nhất là: E = 95 - 110 %; R2≥0,99 - 1; Slope = -3,3 - -3.6
Chứng âm	-	+(CT<38)	Có giá trị

- Các trường hợp cần kiểm tra lại:

TT	Màu FAM	Màu HEX	Kết quả
Chứng dương	-	+	Cần kiểm tra lại
Chứng âm	+	-	Cần kiểm tra lại

10.1.2. Đọc kết quả

- Phân tích standard:

+ Hệ số tuyến tính (R2) phải nằm trong khoảng 0.960-1.000, tốt nhất 0.990-1.000.

+ Hiệu suất nhân bản (PCR efficiency) phải nằm trong khoảng 90-115%, tốt nhất 95-110%.

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

TT	Màu FAM	Màu HEX	Kết quả
1	+	±	Dương tính với HCV
2	-	+	Không phát hiện virus HCV
3	-	+(CT>38)	Không có giá trị
4	-	-	Không có giá trị

- Với những mẫu dương tính, sử dụng công thức sau để tính nồng độ virus trong mẫu: $IU/ml = (SC \times EV)/IV$

Trong đó: SC (Sample Concentration) = Nồng độ virus trong mẫu (IU/μl)

EV (Elution Volume) = Thể tích mẫu thu sau tách chiết (μl)

IV (Isolation Volume) = Thể tích mẫu dùng để tách chiết (ml)

- Chứng nội chuẩn (IS) được thêm vào mẫu bệnh phẩm trước khi tách chiết để kiểm soát quá trình tách RNA và chạy Real-time PCR. Những mẫu có chứng nội chuẩn không đạt cần phải được kiểm tra lại từ bước tách chiết.
- Những mẫu âm tính, chứng nội phải dương tính thì mới kết luận mẫu âm tính thật sự.

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong người thực hiện cập nhập kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai.

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.
- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.

- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

15. QUY TRÌNH HCV ĐO TẢI LƯỢNG HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.28

1. MỤC ĐÍCH

- Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình HCV đo tải lượng hệ thống tự động từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.
- Phát hiện và định lượng HCV RNA trong huyết tương người trên hệ thống máy PCR tự động xử lý mẫu, khuếch đại và phát hiện

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

- Real-time PCR là sự khuếch đại chọn lọc của một trình tự đích trong khi quá trình điều khiển sự khuếch đại theo thời gian thực thông qua một chất có thể hiện màu, chẳng hạn như một loại thuốc nhuộm huỳnh quang.
- Sự đặc hiệu được cung cấp bởi một cặp mồi đặc hiệu, cùng với một đầu dò thủy phân đã biết trình tự. Kiểm soát sản phẩm khuếch đại được thực hiện bằng cách đánh dấu đầu dò thủy phân với một cặp thuốc nhuộm huỳnh quang (5'-phát quang; 3'- dập phát quang). Do huỳnh quang truyền năng lượng cộng hưởng (FRET), một đầu dò còn nguyên vẹn sẽ không phát ra ánh sáng. Tuy nhiên, khi bị thủy phân bởi DNA polymerase có hoạt tính 5' - 3' exonuclease, trong quá trình PCR, phân tử phát huỳnh quang phát ra một bước sóng đặc biệt trong vùng quang phổ khả kiến khi bị cắt sau khi đã bám vào các amplicon

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- RNA: Acid ribodeoxyribo nucleic

- ATSH: an toàn sinh học
- HCV: Hepatitis C virus
- cDNA: complementary DNA
- STDVKH : Sổ tay dịch vụ khách hàng
- QTQL : Quản lý chất lượng
- XN : Xét nghiệm
- STAT: Sổ tay an toàn

5. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý của kỹ thuật Real-time RT-PCR, là phản ứng PCR trong đó phân tử RNA được phiên mã ngược tạo cDNA và kết quả khuếch đại DNA đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng. HCV master mix chứa đoạn dò kép phát hiện đặc hiệu cho các trình tự đích HCV và chứng nội chuẩn RNA-QS (Ribonucleic acid - Quantitation Standard). Các đoạn dò được đánh dấu với các chất phát huỳnh quang đặc hiệu với đích, cho phép phát hiện đồng thời HCV mục tiêu và RNA-QS trong hai kênh đích khác nhau. Với mỗi chu kỳ PCR, số lượng của đoạn dò đã phân tách được tạo ra càng tăng và tín hiệu tích lũy của chất phát huỳnh quang đồng thời tăng. Việc phát hiện và phân biệt real-time các sản phẩm PCR được thực hiện bằng cách đo huỳnh quang của các chất phát huỳnh quang được giải phóng ra tương ứng với HCV và RNA-QS.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư"

mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 180 phút (3 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng

- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L tiệt trùng
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

- Đăng nhập hệ thống
- Nạp mẫu lên hệ thống
- + Nạp giá mẫu thử lên hệ thống
- + Hệ thống tự động chuẩn bị
- + Tạo lệnh xét nghiệm
- Thêm thuốc thử và vật tư tiêu hao theo yêu cầu của hệ thống
- + Nạp đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm
- + Nạp giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng)
- + Nạp các đầu típ xử lý
- + Nạp các đầu típ rửa giải
- + Nạp các đĩa xử lý

- + Nạp các đĩa chất thải lỏng
- + Nạp các đĩa khuếch đại
- + Nạp hộp cassette MGP
- + Thêm chất pha loãng mẫu
- + Thêm thuốc thử ly giải
- + Thêm đệm rửa
- Bắt đầu chạy xét nghiệm bằng cách chọn nút Start processing trên giao diện người sử dụng, tất cả các mẻ chạy sau đó sẽ được tự động bắt đầu nếu không bị hoãn thủ công bởi người sử dụng.
- Kiểm tra và xuất kết quả
- Lấy ra và đậy nắp bất kỳ ống mẫu nào đáp ứng yêu cầu thể tích tối thiểu để sử dụng thêm nếu cần. Vệ sinh thiết bị
- + Lấy giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) đã hết ra khỏi máy
- + Lấy đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm đã hết ra khỏi máy
- + Dọn khay đựng các đĩa khuếch đại
- + Đổ bỏ chất thải lỏng
- + Đổ bỏ chất thải rắn

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

Xem xét kết quả nội kiểm

a. Đánh giá theo yêu cầu của nhà sản xuất

- Hệ thống tự động xác định nồng độ HCV-RNA cho mẫu thử và mẫu chứng với đơn vị là IU/ml.
- Mẻ xét nghiệm hợp lệ nếu không xuất hiện cờ hiệu cho tất cả ba mẫu chứng âm, chứng dương thấp và chứng dương cao.
- Kết quả mẫu chứng âm tính được hiển thị là (-) C.
- Kết quả mẫu chứng dương tính nồng độ thấp và cao được hiển thị là HxV L (+) C và HxV H (+) C.
- Kết quả được tự động gán là không hợp lệ bởi phần mềm khi kết quả của mẫu chứng âm tính hoặc dương tính không đạt.

b. Đánh giá theo yêu cầu phòng xét nghiệm

Đánh giá QC (NC, LPC, HPC) theo hướng dẫn theo dõi QC của phòng xét nghiệm.

10.2. Đọc kết quả

- Đọc kết quả của mẫu chứng trong ứng dụng “Controls- Valid: nếu tất cả kết quả được báo cáo hợp lệ
- Invalid: nếu tất cả kết quả được báo cáo là không hợp lệ
- + Mẫu chứng được hiển thị ‘Invalid’ sẽ xuất hiện cờ hiệu ở cột “Flags”. Thông tin thêm về lý do mẫu chứng được báo cáo là không hợp lệ, bao gồm cả thông tin cờ hiệu được hiển thị trong chế độ xem thông tin chi tiết.
- + Nếu một trong các mẫu chứng dương tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các mẫu chứng dương tính và mẫu thử có liên quan.
- + Nếu mẫu chứng âm tính là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các chứng và mẫu thử có liên quan.

Đọc kết quả của mẫu bệnh phẩm

- Đơn vị đo: IU/mL/copies/mL

Kết quả	Biện luận
Không phát hiện	Không phát hiện RNA HCV. Báo cáo kết quả là "Không phát hiện HCV"
< Nồng độ tối thiểu	Nồng độ tính nằm dưới Giới hạn định lượng dưới (LLoQ) của xét nghiệm.
> Nồng độ tối đa	Nồng độ tính nằm trên Giới hạn định lượng trên (ULoQ) của xét nghiệm. Báo cáo kết quả là "Phát hiện HCV, cao hơn (Nồng độ tối đa)

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

- Kết quả mẫu > Nồng độ tối đa là do những mẫu dương tính với HCV được phát hiện với nồng độ nằm trên giới hạn định lượng trên (ULoQ). Nếu muốn thu được kết quả định lượng, phải pha loãng mẫu ban đầu với huyết tương chống đông bằng EDTA hoặc huyết thanh âm tính với HCV, tùy thuộc vào loại mẫu ban đầu, và xét nghiệm nên được thực hiện lại. Nhân kết quả xét nghiệm thu được với hệ số pha loãng.
 - Trước khi thực hiện kỹ thuật
- Sai sót có thể do lấy, đóng gói, bảo quản hoặc vận chuyển mẫu bệnh phẩm

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

- Trong quá trình thực hiện kỹ thuật- Kết quả đo tải lượng HCV bị ảnh hưởng khi nồng độ hemoglobin trong mẫu > 250mg/dL.

- Kết quả có thể âm tính giả trong các trường hợp sau:

+ Mẫu bệnh phẩm có lẫn các chất gây ức chế phản ứng: heparin

+ Môi trường:

- Sử dụng quá nhiều a-xít hypochlorous trong khử nhiễm phòng thí nghiệm.
- Sử dụng găng có bột talc khi thực hiện xét nghiệm.

- Kết quả có thể dương tính giả trong các trường hợp sau:

+ Có sự lây nhiễm chéo giữa các mẫu bệnh phẩm.

+ Lây nhiễm các sản phẩm khuyếch đại từ lần phản ứng trước.

- Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

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

+ Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm

4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

16. QUY TRÌNH CORONAVIRUS REAL-TIME PCR

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.29

1. MỤC ĐÍCH

Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình Coronavirus real-time PCR, từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại Trung tâm Xét nghiệm, Bệnh viện đa khoa số 2 tỉnh Lào cai .
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Không áp dụng

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- STDVKH : Sổ tay dịch vụ khách hàng
- QTQL : Quản lý chất lượng
- XN : Xét nghiệm
- STAT: Sổ tay an toàn

5. NGUYÊN LÝ

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

6. TRANG THIẾT BỊ

- Máy real-time PCR và hệ thống máy vi tính

- Hệ thống máy tách chiết tự động hoặc hóa chất tách thủ công.
- Bộ lưu điện
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy ly tâm dùng cho tube 0.2ml
- Máy ly tâm 25000 x g
- Máy ủ nhiệt
- Máy vortex
- Tủ lạnh 2^oC – 8^oC
- Tủ âm sâu (-20^oC) hoặc (-70^oC)
- Micropipettes các thể tích từ 5-1000 μ l

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm miễn dịch" mã số XN.QTQL.8.3.3
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Khoảng 60 phút (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm)

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2. (không áp dụng với những mẫu bệnh phẩm do TTXN lấy trực tiếp)

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L- tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml - Tuýp 15 ml - Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml

- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

9.3.1. Xử lý bệnh phẩm: theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Lưu ý cần xử lý với các mẫu nhầy: thêm 2 thể tích dung dịch 1X PBS hoặc dung dịch muối vào 1 thể tích mẫu, vortex để phân tán mẫu

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

a. Tách chiết acid nucleic 10 μ L IC cần được bổ sung vào mẫu trước khi bắt đầu quá trình tách chiết acid nucleic như bảng sau. IC có thể được bổ sung vào dung dịch dung giải hoặc bổ sung vào hỗn hợp mẫu bệnh phẩm và dung dịch dung giải.

b. Thực hiện phản ứng Real-time RT-PCR

- Bật thiết bị chính và máy tính.
- Khởi động phần mềm real-time PCR
- Chuẩn bị MasterMix, cụ thể: Lưu ý: Tính thể tích từng loại hóa chất để chuẩn bị MasterMix căn cứ theo số phản ứng cần chạy (mẫu bệnh phẩm và chứng):
Số phản ứng = Số mẫu + Số chứng + 1 + Trộn các thành phần bằng cách vortex nhanh hoặc hút trộn khoảng 5 lần sau đó ly tâm nhanh (spin) trước khi phân phối vào các ống phản ứng.
- + Chia 17 μ l MasterMix vào mỗi ống phản ứng. Lưu ý: sử dụng đúng loại ống phản ứng và nắp theo yêu cầu của bộ kit (ống trắng và nắp trong)
- Đánh dấu tên mẫu trên phần thân sát nắp ống.
- Thêm 8 μ l sản phẩm đã tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng vào mỗi ống MasterMix.
- Đóng nắp và ly tâm nhẹ các ống phản ứng.
- Đặt ống phản ứng vào máy real-time PCR.

- Cài đặt chu trình nhiệt trên máy Real-time PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Cài đặt sơ đồ mẫu
- Chọn kênh màu: FAM, HEX, Cal Red 610 và Quasar 670
- Chọn các mẫu thích hợp: mẫu bệnh phẩm, chứng âm, chứng dương. Lưu ý: chọn loại đĩa: BR White
- Bắt đầu chạy chương trình. Lưu file dữ liệu vào thư mục thích hợp.
- Bắt đầu quá trình chạy realtime PCR

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

10.1.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu. Chứng dương phải xuất hiện đồ thị huỳnh quang trên đường giới hạn cơ bản, chứng âm không có bất kỳ đường đồ thị huỳnh quang nào xuất hiện.

10.1.2. Đọc kết quả Phân tích mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khi quá trình Real-time PCR kết thúc, xuất kết quả vào thư mục đích.
- Phân tích kết quả trong phần mềm của nhà sản xuất cài đặt trên máy tính.
- Diễn giải kết quả:
 - + Kết quả dương khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) ≤ 42 .
 - + Kết quả âm khi giá trị chu kì ngưỡng (Ct) > 42 hoặc N/A

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong người thực hiện cập nhập kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý: Những sai sót và xử trí

11.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

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

11.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

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

- Phản ứng PCR bị ức chế:

⇒ Kiểm tra phương pháp tách chiết DNA theo khuyến cáo.

- Điều kiện bảo quản thuốc thử không đúng theo hướng dẫn:

⇒ Kiểm tra điều kiện bảo quản.

- Điều kiện PCR không đúng theo hướng dẫn:

⇒ Kiểm tra điều kiện PCR và kênh huỳnh quang cho phát hiện IC trong quy trình.

- Không thêm IC vào các mẫu trong khi hút thuốc thử:

⇒ Thêm IC trong quá trình tách chiết RNA.

11.2.2. Tín hiệu của mẫu yếu ($Ct > 37$): lặp lại xét nghiệm.

11.2.3. Chứng âm xuất hiện tín hiệu dương tính:

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

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

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

⇒ Lặp lại bước tách chiết DNA với bộ thuốc thử mới.

⇒ Thực hiện lại bước chuẩn bị PCR với bộ thuốc thử mới

11.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

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

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

- Kết quả nội kiểm được xem xét định kỳ nhằm phát hiện và khắc phục những xu hướng ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.

- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
----	-----------------------	-------------------------

1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”

17. QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN BRAF

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.07

1. MỤC ĐÍCH

Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình xét nghiệm đột biến gen BRAF từ đó tránh được tối đa sai số có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận Sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

BRAF là một gen tiền ung thư trên nhiễm sắc thể số 7, mã hóa cho protein BRAF, một kinase quan trọng trong con đường truyền tín hiệu RAS/MAPK. Con đường này điều khiển các chức năng thiết yếu của tế bào như tăng trưởng, phân chia, biệt hóa và tự hủy. Khi gen BRAF bị đột biến, phổ biến nhất là đột biến điểm V600E, protein B-RAF sẽ bị kích hoạt liên tục, dẫn đến tăng sinh tế bào không kiểm soát và phát sinh ung thư. Đột biến này là một yếu tố thúc đẩy chính trong nhiều loại ung thư như u hắc tố, ung thư tuyến giáp, đại trực tràng và là mục tiêu quan trọng cho các liệu pháp điều trị đích.

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- RNA: Acid ribodeoxyribo nucleic
- ATSH: an toàn sinh học

5. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý lai đặc hiệu cho từng allele (Allele-Specific Hybridization) là một kỹ thuật sinh học phân tử được ứng dụng rộng rãi trong việc phát hiện các đột biến gen. Từ các mẫu mô được cố định bằng formalin và đúc trong parafin

(FFPE). Kỹ thuật này dựa trên khả năng của các đoạn dò DNA ngắn, được gọi là oligonucleotide, chỉ bắt cặp một cách hoàn hảo với một chuỗi DNA đích cụ thể, hoặc là allen bình thường (wild-type) hoặc là allen đột biến.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Bể ổn nhiệt có lắc và điều chỉnh nhiệt độ (45°C ± 1°C).

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.

- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Là tổng thời gian các bước tiến hành xét nghiệm theo thực tế.

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.1mL (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 mL)

- Tuýp 1.7 mL
- Khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

- Các khối parafin chứa bệnh phẩm được cắt lát mỏng và dán lên phiến kính
- Vùng mô ung thư được đánh dấu trên phiến kính
- Cạo mô ung thư vào ống ly tâm 1,5 mL
- Cho xylen vào ống ly tâm 2 lần để khử parafin
- Rửa lại bằng etanol và để khô trước khi ủ với proteinaza K ở 48°C trong 16 giờ

9.3.3.2. Phá màng tế bào và màng nhân:

- Tế bào được ủ trong một dung dịch gồm chất tẩy mạnh (như SDS, sarcosyl), chất gây biến tính protein (guanidinium thyocianat) và chất khử (2 mercaptoethanol). Mục đích của bước này là để phá màng tế bào và màng nhân đồng thời để ức chế hoạt động của các enzym RNase nội bào, biến tính protein để giải phóng các phân tử ADN ở trạng thái tự do.
- Loại bỏ các protein: Sử dụng dung dịch phenol: chloroform để biến tính protein, làm cho protein tạo thành một lớp tủa rõ rệt sau khi ly tâm, dễ dàng loại bỏ khỏi hỗn dịch.
- Tủa ADN: Sử dụng isopropanol hoặc ethanol với muối để tủa ADN trong điều kiện nhiệt độ âm sâu rồi thu nhận ADN bằng ly tâm. DN được tái hòa tan trong nước tinh sạch đã khử enzym (free-nuclease).

9.3.3.3. Thực hiện phản ứng PCR.

- Giữ tất cả hóa chất và ADN khuôn trong khay giữ lạnh. Tiến hành tất cả các

bước ở trên khay trữ lạnh (0-4°C) cho đến khi bắt đầu chạy máy.

- Chuẩn bị dịch hỗn hợp gồm Taq ADN Polymerase và Taq Dilution Buffer.

- Chuẩn bị thành phần cho phản ứng PCR cho 1 phản ứng như sau:

+ 15µl Amplification Mix (yellow cap).

+ 5µl Taq DNA polymerase pha loãng (1U).

+ 5µl DNA

- Đóng chặt nắp ống, làm ấm máy luân nhiệt lên 37°C

- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, cài đặt chu trình nhiệt:

+ Tiền PCR: 37°C/10 phút.

94°C/2 phút.

+ Khuếch đại:

94°C/1 phút

70°C/50 giây

56°C/90 giây

60°C/ 1 phút (35 chu kỳ)

Kéo dài cuối: 60°C/3 phút

Bảo quản sản phẩm PCR trên khay đá lạnh hoặc ở 2 đến 8°C cho đến khi sử dụng.

9.3.3.4. Quy trình lai DNA.

Trước khi lai khởi động bể ổn nhiệt và máy lắc ổn nhiệt tới 45°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$). Cho lọ Hybridization Buffer và Wash Solution A vào bể ổn nhiệt để làm ấm trước khi sử dụng

- Lai ADN với teststrip (45°C; máy lắc ổn nhiệt)

+ Kiểm tra nhiệt độ của bể ổn nhiệt và máy lắc. Đảm bảo đạt 45°C trước khi tiến hành.

+ Để tất cả teststrip, ADNT, Conjugate Solution, Wash Solution B và Color Developer ra nhiệt độ phòng.

+ Lấy máng lai và viết ký hiệu trên mỗi rãnh tương ứng với teststrip của mỗi người bệnh.

+ Sử dụng kẹp hoặc nhíp sạch lấy teststrip cho 1 mẫu bệnh phẩm (chỉ cầm teststrip khi đã đeo bao tay!). Ghi ký hiệu ở ngoài vạch đánh dấu của teststrip sử dụng bút chì (không sử dụng bút bi, bút đánh dấu...).

+ Trộn thành phần cho phản ứng lai như sau:

• Hút 10 µl DNAT thả vào 1 góc thấp nhất mỗi giếng tương ứng một mẫu trên Typing Tray

- Bổ sung 10 µl amplification product A vào giọt DNAT.

Mix đều bằng pipet. (*Dung dịch có màu xanh.*)

- Để yên trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Bổ sung 1 mL Hybridization Buffer (làm ấm lên 45°C) vào mỗi giếng.

Lắc nhẹ khay lai. (*Màu xanh biến mất*)

- Thả Teststrips đã đánh dấu kí hiệu mẫu vào giếng lai tương ứng sao cho ngập thanh lai.

- Ủ 30 phút ở 45°C trên máy ủ lắc.

Cài đặt tốc độ lắc của máy khoảng 50rpm để tránh tràn dung dịch từ giếng lai này qua giếng lai khác. Nắp của bể ổn nhiệt hoặc máy lắc đóng để tránh sự thay đổi về nhiệt độ.

Kết thúc thời gian ủ, loại bỏ dung dịch lai bằng máy hút chân không.

Thực hiện nhanh. Tránh để thanh teststrip bị khô trong toàn bộ quá trình.

9.3.3.5. Rửa (45°C, bể ổn nhiệt có lắc)

- Bổ sung 1 mL Wash Solution A (làm ấm 45°C). Rửa nhẹ (10 giây). Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Wash Solution A (45°C).

- Ủ 15 phút ở 45°C trong máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Wash Solution A (45°C).

- Ủ 15 phút ở 45°C trong máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

9.3.3.6. Phát màu (nhiệt độ phòng)

- Bổ sung 1 mL Conjugate Solution.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Wash Solution B. Rửa nhẹ (10 giây). Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Wash Solution B.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Wash Solution B.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Color Developer.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trong tối trên máy ủ lắc.

Màu tím sẽ hiện lên ở những vị trí dương tính.

- Rửa Teststrips một vài lần bằng nước cất.

- Để khô teststrip trong tối trên giấy thấm.

Chú ý: Không để Teststrips tiếp xúc với ánh sáng trực tiếp sau bước Phát màu.

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

10.1.1. Xem xét kết quả nội kiểm

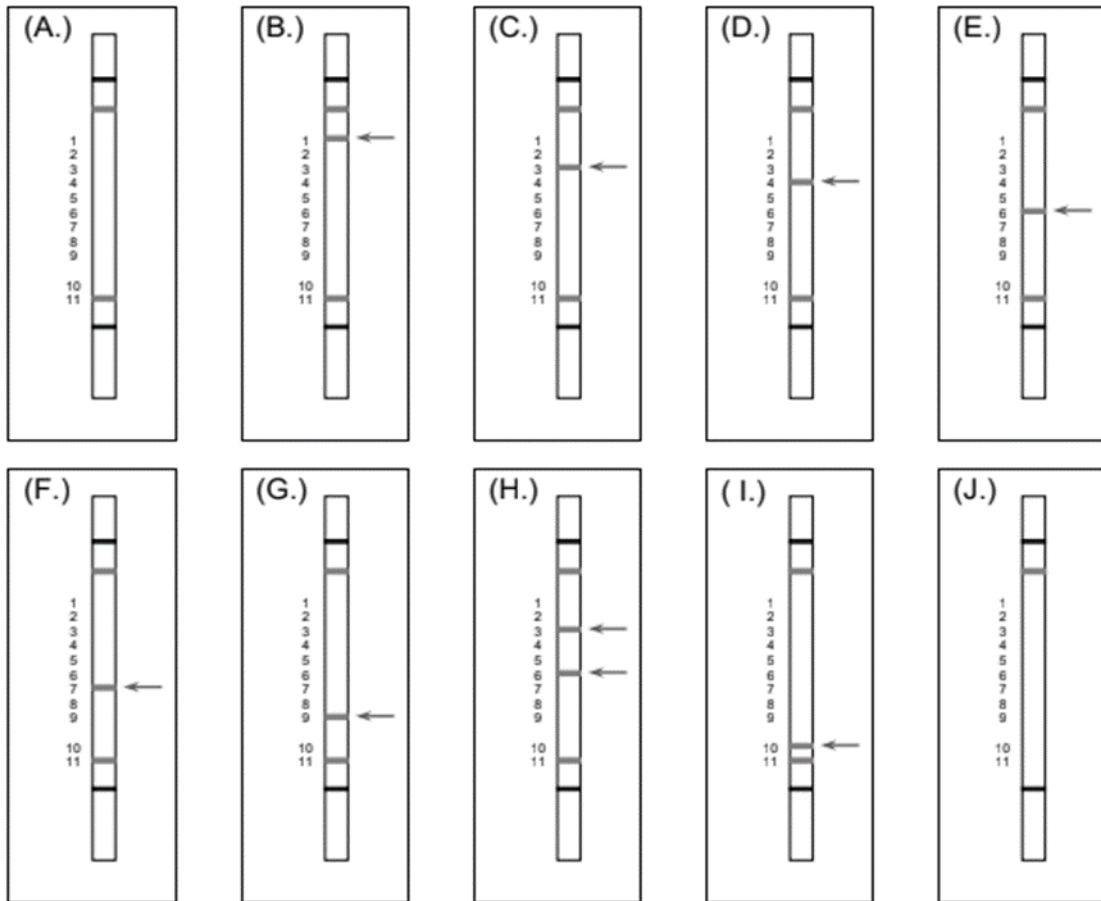
Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận
- Kiểu gen của mẫu được xác định bằng Collector Sheet.
- Dán cố định Teststrip vào vị trí đã định trên Collector Sheet, với vạch màu đỏ ở trên và vạch màu xanh ở dưới bằng băng dính.
- Phản ứng dương tính của băng control ở vị trí cao nhất trên teststrip chứng tỏ chức năng của Conjugate Solution và Color Developer thực hiện chính xác. Băng này luôn luôn dương tính.
- PCR Positive Control dương tính cho thấy sự hiện diện và chất lượng của DNA và thành phần phản ứng PCR cho phân tích đột biến BRAF. Nếu vạch PCR Positive Control âm tính do nguyên nhân DNA, lặp lại xét nghiệm từ bước chuẩn bị DNA.
- PCR Negative Control âm tính cho thấy sự ức chế hoàn toàn khuếch đại các wild-type BRAF codon 12/13, 59/60/61, 117 và 146. Nếu vạch PCR Negative Control dương tính (ví dụ: lượng DNA sử dụng cho PCR quá nhiều), độ nhạy của xét nghiệm sẽ bị giảm.

10.1.2. Đọc kết quả

Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

BRAF (vạch 1 - 9)	PCR Negative Control (Vạch 10)	PCR Positive Control (Vạch 11)	Kết quả
Một hoặc nhiều vạch dương tính	Âm tính	Dương tính	Có đột biến BRAF
Âm tính	Âm tính	Dương tính	Không có đột biến BRAF
Nhiều kết quả	Dương tính	Dương tính	Độ nhạy phát hiện đột biến BRAF giảm
Âm tính	Âm tính	Âm tính	Chứng âm hoặc xét nghiệm hỏng



- (A.) Không có đột biến BRAF
 (B.) BRAF p.V600A present
 (C.) BRAF p.V600E (c.1799T>A) present
 (D.) BRAF p.V600E (c.1799_1800delTGinsAA) present
 (E.) BRAF p.V600K present
 (F.) BRAF p.V600M present
 (G.) BRAF p.K601E present
 (H.) BRAF p.V600E + p.V600K present
 (I.) Không có đột biến BRAF, độ nhạy giảm
 (J.) Chứng âm hoặc PCR không thành công

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.

- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

- Hiểu rõ về quy trình, thiết bị phòng thí nghiệm và các yêu cầu kỹ thuật để đạt kết quả đáng tin cậy.
- Không sử dụng các thành phần của kit đã hết hạn in trên vỏ hộp. Không trộn lẫn thành phần thuốc thử của các lô khác nhau.
- Tránh nhiễm vi sinh và nhiễm chéo thuốc thử hoặc mẫu bệnh phẩm bằng cách sử dụng pipette vô trùng một lần. Không đổi các nắp của các thuốc thử.
- Bảng Control được cố định trên mỗi Teststrip cho phép kiểm soát hiệu suất của phản ứng phát màu. Để theo dõi và đánh giá tính đặc hiệu của các bước lai và rửa, mẫu DNA kiểm soát đã biết trước kiểu gen nên được sử dụng cùng mỗi mẻ xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.
- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.

- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 5199 /QĐ-BYT ngày 25/12/2013 về việc “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành giải phẫu bệnh – Tế bào học”

18. QUY TRÌNH QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN EGFR

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.08

1. MỤC ĐÍCH

Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình xét nghiệm đột biến gen EGFR, từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại Trung tâm Xét nghiệm, Bệnh viện đa khoa số 2 tỉnh Lào cai .
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

EGFR: thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì, là một dạng đột biến gen quy định protein EGFR trên bề mặt tế bào, thường gặp ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ.

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- ATSH: an toàn sinh học
- DNA: Axit deoxyribonucleic
- EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
- PCR: Polemerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi polymerase)

NGUYÊN LÝ

Nguyên lý xét nghiệm đột biến gen EGFR dựa trên việc phát hiện các thay đổi trong gen EGFR từ mẫu bệnh phẩm của khối u, thường là qua giải trình tự gen hoặc các kỹ thuật phân tử khác như PCR. Quy trình bao gồm thu thập mẫu sinh thiết, tách chiết DNA từ mẫu, khuếch đại đoạn gen mục tiêu, sau đó

phân tích sự hiện diện của các đột biến EGFR để xác định xem bệnh nhân có phù hợp với các thuốc điều trị đích (TKI) hay không.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm lạnh đa năng (tốc độ tối đa 14000 vòng/phút)
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung và điều chỉnh nhiệt độ ($45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh $2^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 μl đến 1000 μl

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm

Khoảng 300 phút (5 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm).

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2. (không áp dụng với những mẫu bệnh phẩm do TTXN lấy trực tiếp)

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chuẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.1ml (8 tuýp/1 thanh)
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml

- Tuýp 50 ml
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ, KTV, hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm

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

a. Tách chiết DNA

Phương pháp tách chiết DN cơ bản bao gồm các giai đoạn chính sau:

Phá màng tế bào và màng nhân:

- Tế bào được ủ trong một dung dịch gồm chất tẩy mạnh (như SDS, sarcosyl), chất gây biến tính protein (guanidinium thiocyanat) và chất khử (2 mercaptoethanol). Mục đích của bước này là để phá màng tế bào và màng nhân đồng thời để ức chế hoạt động của các enzym RNase nội bào, biến tính protein để giải phóng các phân tử ADN ở trạng thái tự do.

- *Loại bỏ các protein:* Sử dụng dung dịch phenol: chloroform để biến tính protein, làm cho protein tạo thành một lớp tủa rõ rệt sau khi ly tâm, dễ dàng loại bỏ khỏi hỗn dịch.

- *Tủa ADN:* Sử dụng isopropanol hoặc ethanol với muối để tủa ADN trong điều kiện nhiệt độ âm sâu rồi thu nhận ADN bằng ly tâm. DN được tái hòa tan trong nước tinh sạch đã khử enzym (free-nuclease).

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Giữ tất cả hóa chất và ADN khuôn trong khay giữ lạnh. Tiến hành tất cả các bước ở trên khay trữ lạnh (0-4°C) cho đến khi bắt đầu chạy máy.

- Chuẩn bị dịch hỗn hợp gồm Taq ADN Polymerase và Taq Dilution Buffer.
- Chuẩn bị thành phần cho phản ứng PCR theo bảng sau:

Mix A	Mix B
15 µl Amplification Mix A	15 µl Amplification Mix A
5 µl Taq DNA polymerase pha loãng (1U)	5 µl diluted Taq DNA polymerase (1U)
5 µl DNA	5 µl DNA

- Đóng chặt nắp ống, làm ấm máy luân nhiệt lên 37°C
- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, cài đặt chu trình nhiệt:

+ Tiền PCR: 37°C/10 phút.

94°C/2 phút.

+ Khuếch đại: 94°C/15 giây - 70°C/60 giây - 58°C/90 giây (33 chu kỳ)

+ Kéo dài cuối: 60°C/3 phút

Bảo quản sản phẩm PCR trên khay đá lạnh hoặc ở 2/8°C cho đến khi sử dụng.

c. Quy trình lai DNA

Trước khi lai khởi động bể ổn nhiệt và máy lắc ổn nhiệt tới 45°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$). Cho lọ Hybridization Buffer và Wash Solution A vào bể ổn nhiệt để làm ấm trước khi sử dụng

- Lai ADN với teststrip (45°C; máy lắc ổn nhiệt)

+ Kiểm tra nhiệt độ của bể ổn nhiệt và máy lắc. Đảm bảo đạt 45°C trước khi tiến hành.

+ Để tất cả teststrip, ADNT, Conjugate Solution, Wash Solution B và Color Developer ra nhiệt độ phòng.

+ Lấy máng lai và viết ký hiệu trên mỗi rãnh tương ứng với teststrip của mỗi người bệnh.

+ Sử dụng kẹp hoặc nhíp sạch lấy teststrip cho 1 mẫu bệnh phẩm (chỉ cầm teststrip khi đã đeo bao tay!). Ghi ký hiệu ở ngoài vạch đánh dấu của teststrip sử dụng bút chì (không sử dụng bút bi, bút đánh dấu...).

+ Trộn thành phần cho phản ứng lai như sau:

Hút **20 µl DNAT** thả vào 1 góc thấp nhất mỗi giếng tương ứng một mẫu trên Typing Tray

Bổ sung **10 µl amplification product A** vào giọt DNAT.

Bổ sung **10 µl amplification product B** vào giọt DNAT.

Mix đều bằng pipet. (*Dung dịch có màu xanh.*)

Đề yên trong **5 phút** ở nhiệt độ phòng.

Bổ sung **1 ml Hybridization Buffer** (làm ấm lên 45°C) vào mỗi giếng.

Lắc nhẹ khay lai. (*Màu xanh biến mất*)

Thả **Teststrips** đã đánh dấu kí hiệu mẫu vào giếng lai tương ứng sao cho ngập thanh lai.

Ủ **30 phút** ở **45°C** trên máy ủ lắc.

Cài đặt tốc độ lắc của máy khoảng 50rpm để tránh tràn dung dịch từ giếng lai này qua giếng lai khác. Nắp của bể ổn nhiệt hoặc máy lắc đóng để tránh sự thay đổi về nhiệt độ.

Kết thúc thời gian ủ, loại bỏ dung dịch lai bằng máy hút chân không.

Thực hiện nhanh. Tránh để thanh teststrip bị khô trong toàn bộ quá trình.

d. Rửa (45°C, bể ổn nhiệt có lắc)

- Bổ sung 1 ml Wash Solution A (làm ấm 45°C). Rửa nhẹ (10 giây). Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Wash Solution A (45°C).

- Ủ 15 phút ở 45°C trong máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Wash Solution A (45°C).

- Ủ 15 phút ở 45°C trong máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

e. Phát màu (nhiệt độ phòng)

- Bổ sung 1 ml Conjugate Solution.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Wash Solution B. Rửa nhẹ (10 giây). Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Wash Solution B.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Wash Solution B.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Color Developer.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trong tối trên máy ủ lắc.

Màu tím sẽ hiện lên ở những vị trí dương tính.

- Rửa Teststrips một vài lần bằng nước cất.

- Để khô teststrip trong tối trên giấy thấm.

Không để Teststrips tiếp xúc với ánh sáng trực tiếp sau bước phát màu.

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

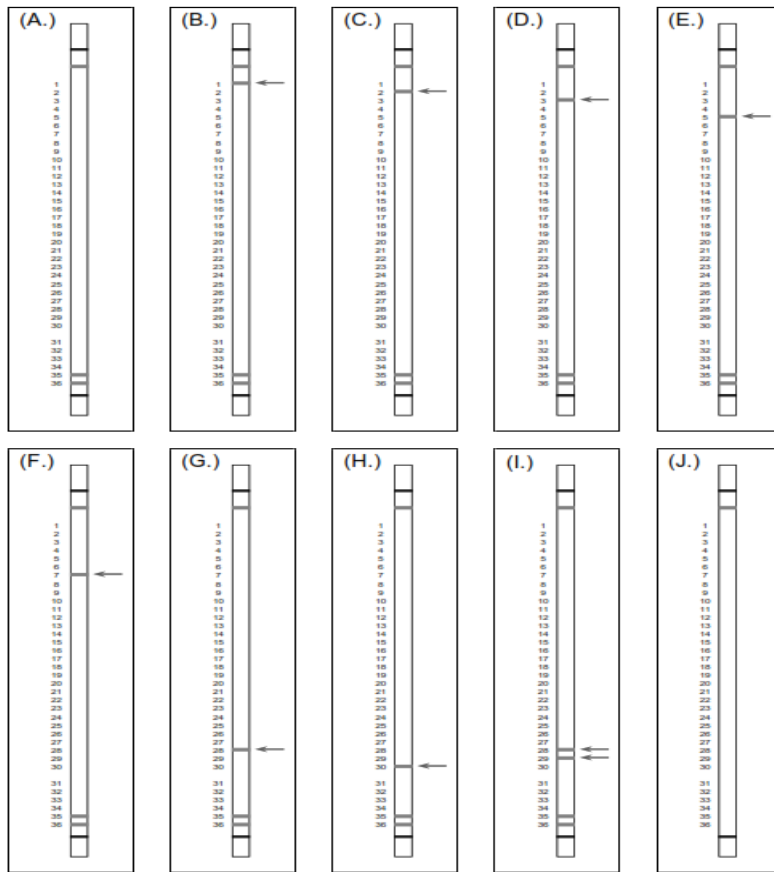
10.1. Diễn giải kết quả

- Kiểu gen của mẫu được xác định bằng Collector Sheet.
- Dán cố định Teststrip vào vị trí đã định trên Collector Sheet, với vạch màu đỏ ở trên và vạch màu xanh ở dưới bằng băng dính.
- Phản ứng dương tính của băng control ở vị trí cao nhất trên teststrip chứng tỏ chức năng của Conjugate Solution và Color Developer thực hiện chính xác. Băng này luôn luôn dương tính.
- PCR Positive Control dương tính cho thấy sự hiện diện và chất lượng của DNA và thành phần phản ứng PCR cho phân tích đột biến. Nếu vạch PCR Positive Control âm tính do nguyên nhân DNA, lặp lại xét nghiệm từ bước chuẩn bị DNA.
- PCR Negative Control âm tính cho thấy sự ức chế hoàn toàn khuếch đại các wild-type EGFR amplification. Nếu vạch PCR Negative Control dương tính (ví dụ: lượng DNA sử dụng cho PCR quá nhiều), độ nhạy của xét nghiệm sẽ bị giảm.

EGFR (vạch 1-30)	PCR Negative Control (Vạch 31-34)	PCR Positive Control (Vạch 35-36)	Kết quả
Một hoặc nhiều vạch dương tính	Âm tính	Dương tính	Có đột biến EGFR
Âm tính	Âm tính	Dương tính	Không có đột biến EGFR
Nhiều kết quả	Dương tính	Dương tính	Độ nhạy phát hiện đột biến EGFR giảm
Âm tính	Âm tính	Âm tính	Chứng âm hoặc xét nghiệm hỏng

Lưu ý: cường độ màu nhuộm của các vạch dương tính có thể khác nhau.

Ví dụ kết quả:



(A.) Không có đb EGFR

(B.) EGFR ex18 c.2156G>C

(C.) EGFR ex18 c.2155G>T

(D.) EGFR ex18 c.2155G>A
c.2573T>G

(E.) EGFR ex19 c.2235_2249del
công

(F.) EGFR ex19 c.2236_2250del

(G.) EGFR ex20 c.2369C>T

(H.) EGFR ex21 c.2582T>A

(I.) EGFR ex20 c.2369C>T + ex21

(J.) Chứng âm hoặc PCR không thành công

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong người thực hiện cập nhập kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

- Hiểu rõ về quy trình, thiết bị phòng thí nghiệm và các yêu cầu kỹ thuật để đạt kết quả đáng tin cậy.
- Không sử dụng các thành phần của kit đã hết hạn in trên vỏ hộp. Không trộn lẫn thành phần thuốc thử của các lô khác nhau.
- Tránh nhiễm vi sinh và nhiễm chéo thuốc thử hoặc mẫu bệnh phẩm bằng cách

sử dụng pipette vô trùng một lần. Không đổi các nắp của các thuốc thử.

- Bảng Control được cố định trên mỗi Teststrip cho phép kiểm soát hiệu suất của phản ứng phát màu. Để theo dõi và đánh giá tính đặc hiệu của các bước lại và rửa, mẫu DNA kiểm soát đã biết trước kiểu gen nên được sử dụng cùng mỗi mẻ xét nghiệm.

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.
- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”
- QĐ 4825/QĐ - BYT, quyết định về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ”

19. QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN KRAS

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.09

1. MỤC ĐÍCH

Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình xét nghiệm đột biến gen KRAS từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại bộ phận sinh học phân tử, Trung tâm Xét nghiệm.
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

Xét nghiệm đột biến gen KRAS là xét nghiệm chẩn đoán phân tử cho ung thư đại trực tràng và ung thư phổi không tế bào nhỏ. Mục đích chính của xét nghiệm này là để dự đoán khả năng đáp ứng với các liệu pháp kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì, như cetuximab và panitumumab. Các khối u mang đột biến KRAS, phổ biến nhất ở codon 12 và 13, thường không đáp ứng với các thuốc này do tín hiệu tăng sinh tế bào được kích hoạt liên tục ở hạ nguồn EGFR. Do đó, việc xác định trạng thái đột biến KRAS giúp phân loại bệnh nhân để lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp, tránh các độc tính không cần thiết và tối ưu hóa hiệu quả điều trị.

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- RNA: Acid ribodeoxyribo nucleic
- ATSH: an toàn sinh học

5. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý lai đặc hiệu cho từng allen (Allele-Specific Hybridization) là

một kỹ thuật sinh học phân tử được ứng dụng rộng rãi trong việc phát hiện các đột biến gen. Từ các mẫu mô được cố định bằng formalin và đúc trong parafin (FFPE). Kỹ thuật này dựa trên khả năng của các đoạn dò DNA ngắn, được gọi là oligonucleotide, chỉ bắt cặp một cách hoàn hảo với một chuỗi DNA đích cụ thể, hoặc là allen bình thường (wild-type) hoặc là allen đột biến.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm thường.
- Hệ thống máy PCR tự động và máy tính có cài đặt phần mềm.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C
- Tủ lạnh âm sâu -20°C hoặc -70°C
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Máy vortex
- Bộ lưu điện
- Bể ổn nhiệt có lắc và điều chỉnh nhiệt độ (45°C ± 1°C).

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện tần suất chạy nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định của Bệnh viện.
- Xem xét kết quả nội kiểm theo "Quy trình nội kiểm tra xét nghiệm PCR" mã số XN.QTQL.8.3.5
- Thực hiện ngoại kiểm theo "Quy trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm" mã số XN.QTQL.8.5.
- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.

- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm (tham khảo MSDS của nhà sản xuất).

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm: Là tổng thời gian các bước tiến hành xét nghiệm theo thực tế.

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2.

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Bộ mẫu chứng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.1mL (8 tuýp/1 thanh)

- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 mL)
- Tuýp 1.7 mL
- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ/KTV/hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay

9.3.3. Tiến hành kỹ thuật

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

- Các khối parafin chứa bệnh phẩm được cắt lát mỏng và dán lên phiến kính
- Vùng mô ung thư được đánh dấu trên phiến kính
- Cạo mô ung thư vào ống ly tâm 1,5 mL
- Cho xylen vào ống ly tâm 2 lần để khử parafin
- Rửa lại bằng etanol và để khô trước khi ủ với proteinaza K ở 48°C trong 16 giờ

9.3.3.2: Phá màng tế bào và màng nhân:

- Tế bào được ủ trong một dung dịch gồm chất tẩy mạnh (như SDS, sarcosyl), chất gây biến tính protein (guanidinium thyocianat) và chất khử (2 mercaptoethanol). Mục đích của bước này là để phá màng tế bào và màng nhân đồng thời để ức chế hoạt động của các enzym RNase nội bào, biến tính protein để giải phóng các phân tử ADN ở trạng thái tự do.

- Loại bỏ các protein: Sử dụng dung dịch phenol, chloroform để biến tính protein, làm cho protein tạo thành một lớp tủa rõ rệt sau khi ly tâm, dễ dàng loại bỏ khỏi hỗn dịch.

- Tủa ADN: Sử dụng isopropanol hoặc ethanol với muối để tủa ADN trong điều kiện nhiệt độ âm sâu rồi thu nhận ADN bằng ly tâm. DN được tái hòa tan trong nước tinh sạch đã khử enzym (free-nuclease).

9.3.3.3. Thực hiện phản ứng PCR.

- Giữ tất cả hóa chất và ADN khuôn trong khay giữ lạnh. Tiến hành tất cả các bước ở trên khay trữ lạnh (0-4°C) cho đến khi bắt đầu chạy máy.
 - Chuẩn bị dịch hỗn hợp gồm Taq ADN Polymerase và Taq Dilution Buffer.
 - Chuẩn bị thành phần cho phản ứng PCR cho 1 phản ứng như sau:
 - + 15µl Amplification Mix (yellow cap).
 - + 5µl Taq DNA polymerase pha loãng (1U).
 - + 5µl DNA
 - Đóng chặt nắp ống, làm ấm máy luân nhiệt lên 37°C
 - Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, cài đặt chu trình nhiệt:
 - + Tiền PCR: 37°C/10 phút.
 - 94°C/2 phút.
 - + Khuếch đại:
 - 94°C/1 phút
 - 70°C/50 giây
 - 56°C/90 giây
 - 60°C/ 1 phút (35 chu kỳ)
 - Kéo dài cuối: 60°C/3 phút
- Bảo quản sản phẩm PCR trên khay đá lạnh hoặc ở 2 đến 8°C cho đến khi sử dụng.

9.3.3.4. Quy trình lai DNA.

Trước khi lai khởi động bể ổn nhiệt và máy lắc ổn nhiệt tới 45°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$). Cho lọ Hybridization Buffer và Wash Solution A vào bể ổn nhiệt để làm ấm trước khi sử dụng

- Lai ADN với teststrip (45°C; máy lắc ổn nhiệt)
- + Kiểm tra nhiệt độ của bể ổn nhiệt và máy lắc. Đảm bảo đạt 45°C trước khi tiến hành.
- + Để tất cả teststrip, ADNT, Conjugate Solution, Wash Solution B và Color Developer ra nhiệt độ phòng.
- + Lấy máng lai và viết ký hiệu trên mỗi rãnh tương ứng với teststrip của mỗi người bệnh.
- + Sử dụng kẹp hoặc nhíp sạch lấy teststrip cho 1 mẫu bệnh phẩm (chỉ cầm teststrip khi đã đeo bao tay). Ghi ký hiệu ở ngoài vạch đánh dấu của teststrip sử dụng bút chì (không sử dụng bút bi, bút đánh dấu...).
- + Trộn thành phần cho phản ứng lai như sau:
 - Hút 10 µl DNAT thả vào 1 góc thấp nhất mỗi giếng tương ứng một mẫu trên

Typing Tray

- Bổ sung 10 µl amplification product A vào giọt DNAT.

Mix đều bằng pipet. (*Dung dịch có màu xanh.*)

- Để yên trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Bổ sung 1 mL Hybridization Buffer (làm ấm lên 45°C) vào mỗi giếng.

Lắc nhẹ khay lai. (*Màu xanh biến mất*)

- Thả Teststrips đã đánh dấu kí hiệu mẫu vào giếng lai tương ứng sao cho ngập thanh lai.

- Ủ 30 phút ở 45°C trên máy ủ lắc.

Cài đặt tốc độ lắc của máy khoảng 50rpm để tránh tràn dung dịch từ giếng lai này qua giếng lai khác. Nắp của bể ổn nhiệt hoặc máy lắc đóng để tránh sự thay đổi về nhiệt độ.

- Kết thúc thời gian ủ, loại bỏ dung dịch lai bằng máy hút chân không.

Thực hiện nhanh. Tránh để thanh teststrip bị khô trong toàn bộ quá trình.

9.3.3.5. Rửa (45°C, bể ổn nhiệt có lắc)

- Bổ sung 1 mL Wash Solution A (làm ấm 45°C). Rửa nhẹ (10 giây). Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Wash Solution A (45°C).

- Ủ 15 phút ở 45°C trong máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Wash Solution A (45°C).

- Ủ 15 phút ở 45°C trong máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

9.3.3.6. Phát màu (nhiệt độ phòng)

- Bổ sung 1 mL Conjugate Solution.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Wash Solution B. Rửa nhẹ (10 giây). Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Wash Solution B.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Wash Solution B.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 mL Color Developer.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trong tối trên máy ủ lắc.

Màu tím sẽ hiện lên ở những vị trí dương tính.

- Rửa Teststrips một vài lần bằng nước cất.

- Đổ khô teststrip trong tối trên giấy thấm.

Chú ý: Không để Teststrips tiếp xúc với ánh sáng trực tiếp sau bước Phát màu.

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

10.1. Diễn giải kết quả

10.1.1. Xem xét kết quả nội kiểm

Chỉ đọc kết quả khi QC đạt yêu cầu.

- Chứng âm và chứng dương phải thỏa mãn các điều kiện sau thì các kết quả của mẫu bệnh phẩm mới được chấp nhận

- Kiểu gen của mẫu được xác định bằng Collector Sheet.

- Dán cố định Teststrip vào vị trí đã định trên Collector Sheet, với vạch màu đỏ ở trên và vạch màu xanh ở dưới bằng băng dính.

- Phản ứng dương tính của băng control ở vị trí cao nhất trên teststrip chứng tỏ chức năng của Conjugate Solution và Color Developer thực hiện chính xác. Băng này luôn luôn dương tính.

- PCR Positive Control dương tính cho thấy sự hiện diện và chất lượng của DNA và thành phần phản ứng PCR cho phân tích đột biến KRAS. Nếu vạch PCR Positive Control âm tính do nguyên nhân DNA, lặp lại xét nghiệm từ bước chuẩn bị DNA.

-PCR Negative Control âm tính cho thấy sự ức chế hoàn toàn khuếch đại các wild-type KRAS codon 12/13, 59/60/61, 117 và 146. Nếu vạch PCR Negative Control dương tính (ví dụ: lượng DNA sử dụng cho PCR quá nhiều), độ nhạy của xét nghiệm sẽ bị giảm.

10.1.2. Đọc kết quả

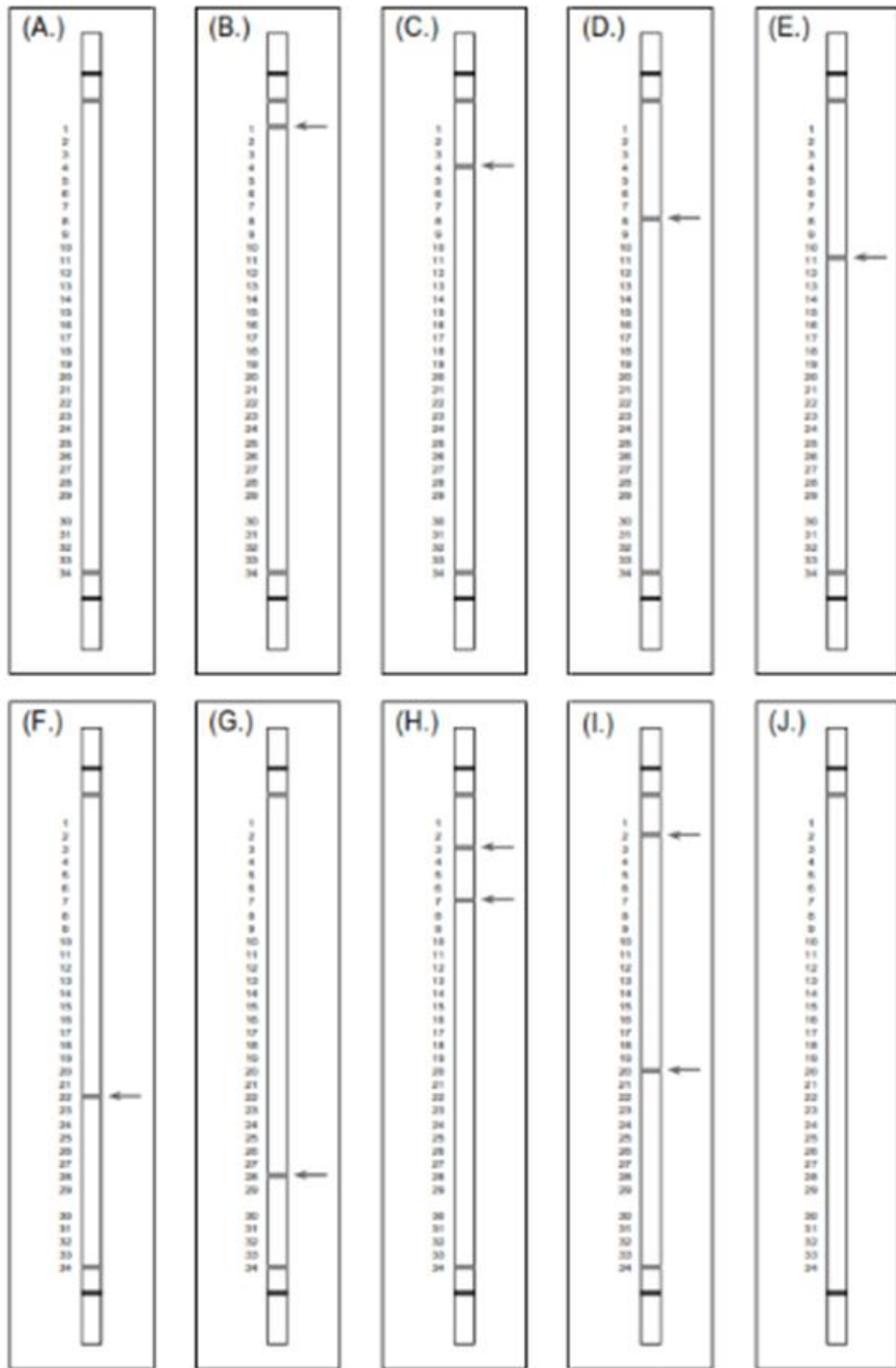
Phân tích mẫu: theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

KRAS (vạch 1-29)	PCR Negative Control (Vạch 30-33)	PCR Positive Control (Vạch 34)	Kết quả
Một hoặc nhiều vạch dương tính	Âm tính	Dương tính	Có đột biến KRAS
Âm tính	Âm tính	Dương tính	Không có đột biến KRAS
Nhiều kết quả	Dương tính	Dương tính	Độ nhạy phát hiện đột biến KRAS giảm

Âm tính	Âm tính	Âm tính	Chứng âm hoặc xét nghiệm hồng
---------	---------	---------	----------------------------------

Lưu ý: cường độ màu nhuộm của các vạch dương tính có thể khác nhau.

Ví dụ kết quả:



- (A.) không có đột biến KRAS
 (B.) KRAS p.Gly12Ala
 (C.) KRAS p.Gly12Cys
 (D.) KRAS p.Gly12Val

- (E.) KRAS p.Gly13Asp
- (F.) KRAS p.Gln61Leu
- (G.) KRAS p.Ala146Thr
- (H.) KRAS p.Gly12Asp + p.Gly12Ser
- (I.) KRAS p.Gly12Arg + p.Gln61His
- (J.) chứng âm hoặc PCR không thành công

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong tự động đổ kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

- Hiểu rõ về quy trình, thiết bị phòng thí nghiệm và các yêu cầu kỹ thuật để đạt kết quả đáng tin cậy.
- Không sử dụng các thành phần của kit đã hết hạn in trên vỏ hộp. Không trộn lẫn thành phần thuốc thử của các lô khác nhau.
- Tránh nhiễm vi sinh và nhiễm chéo thuốc thử hoặc mẫu bệnh phẩm bằng cách sử dụng pipette vô trùng một lần. Không đổi các nắp của các thuốc thử.
- Băng Control được cố định trên mỗi Teststrip cho phép kiểm soát hiệu suất của phản ứng phát màu. Để theo dõi và đánh giá tính đặc hiệu của các bước lai và rửa, mẫu DNA kiểm soát đã biết trước kiểu gen nên được sử dụng cùng mỗi mẻ xét nghiệm.

* Lưu ý: Có thể có các yếu tố làm ảnh hưởng sai lệch tới kết quả xét nghiệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.
- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm

4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 5199 /QĐ-BYT ngày 25/12/2013 về việc “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành giải phẫu bệnh – Tế bào học”

20. QUY TRÌNH QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN NRAS

Mã hiệu: XN.QTKT.SHPT.10

1. MỤC ĐÍCH

Hướng dẫn cho toàn bộ nhân viên trong Trung tâm Xét nghiệm hiểu và tuân thủ theo quy trình xét nghiệm đột biến gen NRAS, từ đó tránh được tối đa sai sót có thể gặp trong giai đoạn trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Quy trình này được áp dụng tại Trung tâm Xét nghiệm, Bệnh viện đa khoa số 2 tỉnh Lào cai .
- Thời gian áp dụng: 24h tất cả các ngày trong tuần.

3. TRÁCH NHIỆM

- Hội đồng khoa học kỹ thuật của Bệnh viện có trách nhiệm thẩm định quy trình.
- Lãnh đạo bệnh viện có trách nhiệm phê duyệt quy trình.
- Lãnh đạo Trung tâm Xét nghiệm, tổ quản lý chất lượng của Trung tâm có trách nhiệm triển khai, duy trì tính hiệu lực của quy trình.
- Tất cả nhân viên Trung tâm Xét nghiệm đã được đào tạo có trách nhiệm áp dụng, tuân thủ việc thực hiện và đề xuất cải tiến quy trình.
- Người đủ thẩm quyền, được giao nhiệm vụ nhận định và ký duyệt kết quả.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa

NRAS: Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homogo, là một gen mã hóa protein NRAS, thuộc họ gen RAS – một nhóm gen quan trọng trong việc điều hòa sự tăng trưởng và phân chia tế bào.

4.2. Thuật ngữ, chữ viết tắt

- ATSH: an toàn sinh học
- DNA: Axit deoxyribonucleic
- NRAS: Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homogo
- PCR: Polemerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi polymerase)

5. NGUYÊN LÝ

Xét nghiệm đột biến gen NRAS dựa trên nguyên lý phân tích DNA để phát hiện các đột biến bằng các kỹ thuật như PCR đặc hiệu, giải trình tự hoặc miễn dịch, thường tập trung vào các vị trí dễ đột biến trong gen này (như coden 12, 13, 61). Những đột biến này có thể làm gen NRAS hoạt động bất thường và

góp phần gây ung thư.

6. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

- Máy ly tâm lạnh đa năng (tốc độ tối đa 14000 vòng/phút)
- Máy ly tâm thường
- Tủ an toàn sinh học cấp II
- Hệ thống tách chiết tự động hoặc tách chiết thủ công.
- Hệ thống máy Real-time PCR và máy vi tính có cài đặt phần mềm
- Bộ lưu điện
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung và điều chỉnh nhiệt độ ($45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)
- Máy Vortex
- Máy ly tâm Spin down
- Tủ lạnh $2^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$
- Tủ lạnh âm sâu -20°C
- Tủ lạnh âm sâu -70°C
- Bộ pipette các kích cỡ từ 1 μl đến 1000 μl

7. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Chất lượng mẫu bệnh phẩm: Quy định tại "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Các hoá chất, sinh phẩm phải được kiểm tra theo "Quy trình quản lý vật tư" mã số XN.QTQL.7.2.

8. AN TOÀN

- Điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của phòng xét nghiệm phù hợp cho hoạt động của trang thiết bị và hóa chất sinh phẩm của phòng xét nghiệm.
- Đeo găng tay, khẩu trang khi làm việc.
- Làm sạch khu vực làm việc với dung dịch sát khuẩn trước và sau mỗi lần làm việc.
- Khi có sự cố tràn đổ bệnh phẩm phải khắc phục theo hướng dẫn trong "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.
- Thực hiện đúng các quy trình xử lý rác thải, mẫu bệnh phẩm, mẫu nội kiểm đã chạy, vỏ lọ hóa chất đã sử dụng theo "Quy trình hướng dẫn an toàn" mã số XN.QTQL.12.2.
- Luôn luôn coi mẫu bệnh phẩm đều có nguy cơ lây truyền các bệnh truyền nhiễm.
- Thực hiện an toàn điện, phòng chống cháy nổ, xử lý khi có sự cố xảy ra trong phòng xét nghiệm theo "Sổ tay an toàn" mã số XN.STAT.

9. NỘI DUNG THỰC HIỆN

9.1. Người thực hiện

Nhân viên y tế có Chứng chỉ hành nghề xét nghiệm.

9.2. Thời gian thực hiện xét nghiệm

Khoảng 300 phút (5 giờ) (bao gồm các bước tiến hành xét nghiệm).

9.3. Các bước tiến hành

9.3.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

a. Lấy bệnh phẩm

Lấy mẫu bệnh phẩm theo đúng quy định của "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.

b. Nhận bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm được chấp nhận khi đạt yêu cầu về chất lượng theo "Sổ tay dịch vụ khách hàng" mã số XN.STDVKH.
- Từ chối với những mẫu bệnh phẩm không đạt yêu cầu ghi vào "Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú" mã số XN.BM.QTQL.8.1.2. (không áp dụng với những mẫu bệnh phẩm do TTXN lấy trực tiếp)

9.3.2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Sinh phẩm chẩn đoán
- Tiêu hao sinh phẩm cho chạy chứng, kiểm tra chất lượng
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh
- Cồn 70%
- Dung dịch nước rửa tay
- Dung dịch khử trùng
- Các vật tư cần thiết tùy theo từng loại thiết bị và sinh phẩm
- Đầu côn (típ) có lọc, 1000 μ L- tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 200 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 20 μ L - tiệt trùng
- Đầu côn (típ) có lọc, 10 μ L - tiệt trùng
- Tuýp 0.2ml vô trùng
- Nắp strip (bằng số tuýp 0,1 ml)
- Tuýp 1.7 ml
- Tuýp 15 ml
- Tuýp 50 ml

- khay đựng bệnh phẩm
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm
- Tube đựng bệnh phẩm
- Giá nhựa cho tuýp 1.7 ml
- Giá nhựa giữ lạnh cho tuýp 0.2 ml
- Panh
- Giấy thấm
- Mũ giấy
- Khẩu trang
- Găng tay không bột
- Găng khám
- Găng tay xử lý dụng cụ
- Quần áo bác sỹ, KTV, hộ lý
- Áo choàng phòng xét nghiệm
- Khăn lau tay
- Bàn xét nghiệm

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

a. Tách chiết DNA

Phương pháp tách chiết DN cơ bản bao gồm các giai đoạn chính sau:

Phá màng tế bào và màng nhân:

- Tế bào được ủ trong một dung dịch gồm chất tẩy mạnh (như SDS, sarcosyl), chất gây biến tính protein (guanidinium thiocyanat) và chất khử (2 mercaptoethanol). Mục đích của bước này là để phá màng tế bào và màng nhân đồng thời để ức chế hoạt động của các enzym RNase nội bào, biến tính protein để giải phóng các phân tử ADN ở trạng thái tự do.

- *Loại bỏ các protein:* Sử dụng dung dịch phenol: chloroform để biến tính protein, làm cho protein tạo thành một lớp tủa rõ rệt sau khi ly tâm, dễ dàng loại bỏ khỏi hỗn dịch.

- *Tủa ADN:* Sử dụng isopropanol hoặc ethanol với muối để tủa ADN trong điều kiện nhiệt độ âm sâu rồi thu nhận ADN bằng ly tâm. DN được tái hòa tan trong nước tinh sạch đã khử enzym (free-nuclease).

b. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Giữ tất cả hóa chất và ADN khuôn trong khay giữ lạnh. Tiến hành tất cả các bước ở trên khay trữ lạnh (0-4°C) cho đến khi bắt đầu chạy máy.

- Chuẩn bị dịch hỗn hợp gồm Taq ADN Polymerase và Taq Dilution Buffer.

- Chuẩn bị thành phần cho phản ứng PCR theo bảng sau:

Mix A	Mix B
15 µl Amplification Mix A	15 µl Amplification Mix A
5 µl Taq DNA polymerase pha loãng (1U)	5 µl diluted Taq DNA polymerase (1U)
5 µl DNA	5 µl DNA

- Đóng chặt nắp ống, làm ấm máy luân nhiệt lên 37°C

- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, cài đặt chu trình nhiệt:

+ Tiền PCR: 37°C/10 phút.

94°C/2 phút.

+ Khuếch đại: 94°C/15 giây - 70°C/60 giây - 58°C/90 giây (33 chu kỳ)

+ Kéo dài cuối: 60°C/3 phút

Bảo quản sản phẩm PCR trên khay đá lạnh hoặc ở 2/8°C cho đến khi sử dụng.

c. Quy trình lai DNA

Trước khi lai khởi động bể ổn nhiệt và máy lắc ổn nhiệt tới 45°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$). Cho lọ Hybridization Buffer và Wash Solution A vào bể ổn nhiệt để làm ấm trước khi sử dụng

- Lai ADN với teststrip (45°C; máy lắc ổn nhiệt)

+ Kiểm tra nhiệt độ của bể ổn nhiệt và máy lắc. Đảm bảo đạt 45°C trước khi tiến hành.

+ Để tất cả teststrip, ADNT, Conjugate Solution, Wash Solution B và Color Developer ra nhiệt độ phòng.

+ Lấy máng lai và viết ký hiệu trên mỗi rãnh tương ứng với teststrip của mỗi người bệnh.

+ Sử dụng kẹp hoặc nhíp sạch lấy teststrip cho 1 mẫu bệnh phẩm (chỉ cầm teststrip khi đã đeo bao tay!). Ghi ký hiệu ở ngoài vạch đánh dấu của teststrip sử dụng bút chì (không sử dụng bút bi, bút đánh dấu...).

+ Trộn thành phần cho phản ứng lai như sau:

Hút **20 µl DNAT** thả vào 1 góc thấp nhất mỗi giếng tương ứng một mẫu trên Typing Tray

Bổ sung **10 µl amplification product A** vào giọt DNAT.

Bổ sung **10 µl amplification product B** vào giọt DNAT.

Mix đều bằng pipet. (Dung dịch có màu xanh.)

Đề yên trong **5 phút** ở nhiệt độ phòng.

Bổ sung **1 ml Hybridization Buffer** (làm ấm lên 45°C) vào mỗi giếng.

Lắc nhẹ khay lai. (*Màu xanh biến mất*)

Thả **Teststrips** đã đánh dấu kí hiệu mẫu vào giếng lai tương ứng sao cho ngập thanh lai.

Ủ **30 phút** ở **45°C** trên máy ủ lắc.

Cài đặt tốc độ lắc của máy khoảng 50rpm để tránh tràn dung dịch từ giếng lai này qua giếng lai khác. Nắp của bể ổn nhiệt hoặc máy lắc đóng để tránh sự thay đổi về nhiệt độ.

Kết thúc thời gian ủ, loại bỏ dung dịch lai bằng máy hút chân không.

Thực hiện nhanh. Tránh để thanh teststrip bị khô trong toàn bộ quá trình.

d. Rửa (45°C, bể ổn nhiệt có lắc)

- Bổ sung 1 ml Wash Solution A (làm ấm 45°C). Rửa nhẹ (10 giây). Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Wash Solution A (45°C).

- Ủ 15 phút ở 45°C trong máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Wash Solution A (45°C).

- Ủ 15 phút ở 45°C trong máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

e. Phát màu (nhiệt độ phòng)

- Bổ sung 1 ml Conjugate Solution.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Wash Solution B. Rửa nhẹ (10 giây). Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Wash Solution B.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Wash Solution B.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy ủ lắc. Đổ bỏ dung dịch.

- Bổ sung 1 ml Color Developer.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trong tối trên máy ủ lắc.

Màu tím sẽ hiện lên ở những vị trí dương tính.

- Rửa Teststrips một vài lần bằng nước cất.

- Để khô teststrip trong tối trên giấy thấm.

Không để Teststrips tiếp xúc với ánh sáng trực tiếp sau bước phát màu.

10. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ VÀ BÁO CÁO

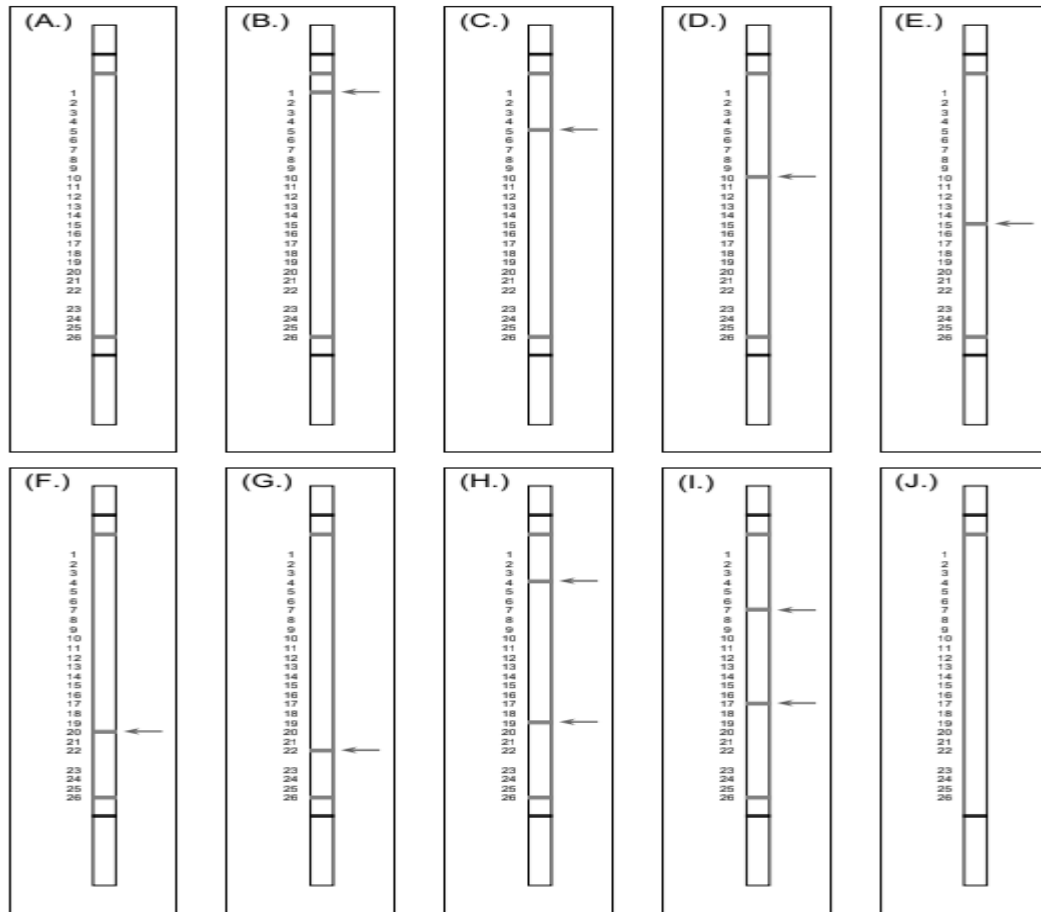
10.1. Diễn giải kết quả

- Kiểu gen của mẫu được xác định bằng Collector Sheet.
- Dán cố định Teststrip vào vị trí đã định trên Collector Sheet, với vạch màu đỏ ở trên và vạch màu xanh ở dưới bằng băng dính.
- Phản ứng dương tính của băng control ở vị trí cao nhất trên teststrip chứng tỏ chức năng của Conjugate Solution và Color Developer thực hiện chính xác. Băng này luôn luôn dương tính.
- PCR Positive Control dương tính cho thấy sự hiện diện và chất lượng của DNA và thành phần phản ứng PCR cho phân tích đột biến. Nếu vạch PCR Positive Control âm tính do nguyên nhân DNA, lặp lại xét nghiệm từ bước chuẩn bị DNA.
- PCR Negative Control âm tính cho thấy sự ức chế hoàn toàn khuếch đại các wild-type KRAS codon 12/13, 59/60/61, 117 và 146. Nếu vạch PCR Negative Control dương tính (ví dụ: lượng DNA sử dụng cho PCR quá nhiều), độ nhạy của xét nghiệm sẽ bị giảm.

BRAF (vạch 1-22)	PCR Negative Control (Vạch 23-25)	PCR Positive Control (Vạch 26)	Kết quả
Một hoặc nhiều vạch dương tính	Âm tính	Dương tính	Có đột biến NRAS
Âm tính	Âm tính	Dương tính	Không có đột biến NRAS
Nhiều kết quả	Dương tính	Dương tính	Độ nhạy phát hiện đột biến NRAS giảm
Âm tính	Âm tính	Âm tính	Chứng âm hoặc xét nghiệm hỏng

Lưu ý: cường độ màu nhuộm của các vạch dương tính có thể khác nhau.

Ví dụ kết quả:



(A.) Không có đb NRAS

(F.) NRAS p.Gln61Lys present

(B.) NRAS p.Gly12Ala present

(G.) NRAS p.Ala146Thr present

(C.) NRAS p.Gly12Ser present
present

(H.) NRAS p.Gly12Cys + p.Gln61Leu

(D.) NRAS p.Gly13Val present
(c.183A>C)

(I.) NRAS p.Gly13Arg + p.Gln61His

(E.) NRAS p.Gln61Arg present
công

(J.) chứng âm hoặc PCR không thành
công

10.2. Báo cáo kết quả

- Máy chạy xong người thực hiện cập nhập kết quả vào phần mềm máy tính.
- Xem xét toàn bộ quá trình trước, trong và sau xét nghiệm trước khi trả kết quả. Không trả kết quả khi phát hiện sai sót.
- Mẫu bệnh phẩm sau khi phân tích được lưu trong tủ lưu mẫu theo "Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm" tại Trung tâm mã số XN.QTQL.8.9.

11. LƯU Ý

- Hiểu rõ về quy trình, thiết bị phòng thí nghiệm và các yêu cầu kỹ thuật để đạt kết quả đáng tin cậy.
- Không sử dụng các thành phần của kit đã hết hạn in trên vỏ hộp. Không trộn

lẫn thành phần thuốc thử của các lô khác nhau.

- Tránh nhiễm vi sinh và nhiễm chéo thuốc thử hoặc mẫu bệnh phẩm bằng cách sử dụng pipette vô trùng một lần. Không đổi các nắp của các thuốc thử.
- Băng Control được cố định trên mỗi Teststrip cho phép kiểm soát hiệu suất của phản ứng phát màu. Để theo dõi và đánh giá tính đặc hiệu của các bước lai và rửa, mẫu DNA kiểm soát đã biết trước kiểu gen nên được sử dụng cùng mỗi mẻ xét nghiệm.

12. LƯU TRỮ HỒ SƠ

- Kết quả được lưu trên phần mềm máy tính.
- Cuối tháng in sổ từ phần mềm máy tính lưu tại Trung tâm.

13. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

TT	Mã quy trình/biểu mẫu	Tên quy trình/ biểu mẫu
1	XN.QTQL.8.9	Quy trình lưu hủy mẫu bệnh phẩm
2	XN.STDVKH	Sổ tay dịch vụ khách hàng
3	XN.QTQL.8.7	Quy trình trả kết quả xét nghiệm
4	XN.STAT	Sổ tay an toàn
5	XN.BM.QTQL.8.1.2	Sổ nhận và từ chối mẫu bệnh phẩm nội trú
6	XN.QTQL.12.2	Quy trình hướng dẫn an toàn

14. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế, Quyết định số 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 Ban hành Hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
- Chính phủ, Nghị định số 103/2016/NĐ-CP ngày 01/7/2016 quy định về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm, 2016.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12/6/2017 Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học, 2017.
- Bộ Y tế, Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 về việc ban hành Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm, 2023.
- Bộ Y tế, Quyết định số 2633/QĐ-BYT ngày 19/08/2025 về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Vi sinh – Tập 1”