

BỘ Y TẾ



**XÉT NGHIỆM ĐẾM TẾ BÀO T-CD4
TRONG ĐIỀU TRỊ HIV/AIDS**

Hà Nội, tháng 12 năm 2012

BỘ Y TẾ

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

Số: 8488/BYT- K2ĐT

V/v Ban hành chương trình và tài liệu
Xét nghiệm đếm tế bào T-CD4
trong điều trị HIV/AIDS.

Hà nội, ngày 11 tháng 12 năm 2012

Kính gửi:

- Các Trường Đại học Y và Đại học kỹ thuật Y tế
- Các Trường Cao đẳng Y tế
- Các Sở Y tế và Bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế

Nhằm nâng cao năng lực chuyên môn cho các cán bộ y tế làm trong lĩnh vực phòng, chống HIV/AIDS và triển khai thông tư số 07/2008/TT-BYT ngày 28/5/2008; Căn cứ vào kết luận của Hội đồng chuyên môn thẩm định chương trình và tài liệu đào tạo được thành lập theo Quyết định số 2757/QĐ-BYT ngày 08/8/2012. Bộ Y tế ban hành chương trình và tài liệu đào tạo **Xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong điều trị HIV/AIDS** – thời gian 3 ngày (24 tiết học) cho đối tượng là các cán bộ y tế trực tiếp tham gia vào công tác xét nghiệm, theo dõi, chăm sóc và điều trị cho người nhiễm HIV/AIDS trong các cơ sở khám chữa bệnh và cộng đồng.

Chương trình và Tài liệu Xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong điều trị HIV/AIDS nhằm mục đích cung cấp, nâng cao kiến thức và kỹ năng về xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong theo dõi điều trị HIV/AIDS, đảm bảo chất lượng và an toàn sinh học phòng xét nghiệm.

Các cơ sở đào tạo khi có nhu cầu về đào tạo về Xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong điều trị HIV/AIDS cần dựa vào nội dung của chương trình và tài liệu đào tạo để tổ chức các khoá đào tạo cho phù hợp, đảm bảo chất lượng và hiệu quả. Trong quá trình sử dụng, đề nghị các cơ sở đào tạo đóng góp ý kiến để tài liệu được hoàn thiện hơn.

TL. BỘ TRƯỞNG
CỤC TRƯỞNG CỤC KHOA HỌC CÔNG NGHỆ
VÀ ĐÀO TẠO

Nơi nhận:

- Như trên;
- Bộ trưởng (để báo cáo);
- TT Nguyễn Việt Tiến (để b/c);
- Cục phòng, chống HIV/AIDS;
- Lưu: VT, K2ĐT.



Nguyễn Công Khẩn

BỘ Y TẾ



XÉT NGHIỆM ĐẾM TẾ BÀO T-CD4 TRONG ĐIỀU TRỊ HIV/AIDS

Tài liệu đào tạo dành cho học viên

Hà Nội, tháng 12 năm 2012

THAM GIA BIÊN SOẠN TÀI LIỆU

1. Chủ biên

- PGS. TS. Nguyễn Thanh Long, Thứ trưởng Bộ Y tế.

2. Phó chủ biên

- PGS. TS. Bùi Đức Dương, Phó Cục trưởng Cục Phòng, chống HIV/AIDS, Bộ Y tế.
- ThS. Phan Thị Thu Hương, Phó Cục trưởng Cục Phòng, chống HIV/AIDS, Bộ Y tế.

3. Nhóm biên soạn

- PGS. TS. Trương Xuân Liên, Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh.
- TS. Nguyễn Văn Kính, Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương.
- ThS. Nguyễn Việt Nga, Cục Phòng, chống HIV/AIDS, Bộ Y tế.
- TS. Lê Thị Hương, Cục Phòng, chống HIV/AIDS, Bộ Y tế.
- TS. Hoàng Đức Mạnh, Cục Phòng, chống HIV/AIDS, Bộ Y tế.
- TS. Tạ Việt Hưng, Bệnh viện 103.
- TS. Nguyễn Ngọc Lan, Bệnh viện Phạm Ngọc Thạch.
- TS. Nguyễn Thị Hoàng Lan, Văn phòng UBPC AIDS TP. Hồ Chí Minh.
- ThS. Hoàng Thị Thanh Hà, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương
- ThS. Lê Chí Thanh, Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh.

4. Thư ký biên soạn

- ThS. Nguyễn Văn Hùng, Cục Phòng, chống HIV/AIDS.

Cùng với sự tham gia của các chuyên gia

- TS. Lê Xuân Hải, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
- BS. CKI. Trần Tôn, Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh.
- TS. Bùi Thị Thu Hiền, Văn phòng CDC Việt Nam.
- TS. Dương Ngọc Cường, Văn phòng CDC Việt Nam.
- ThS. Đỗ Thị Thu Thủy, Quỹ Clinton-Sáng kiến tiếp cận Hệ thống y tế.

MỤC LỤC

LỜI GIỚI THIỆU	5
HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG TÀI LIỆU	6
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT.....	9
BÀI 1. VAI TRÒ TẾ BÀO T-CD4 TRONG NHIỄM HIV/AIDS	10
1. Thông tin cơ bản về HIV/AIDS	10
2. Vai trò tế bào T-CD4 trong đáp ứng miễn dịch.....	12
2.1. Nguồn gốc và quá trình phát triển của tế bào T-CD4.....	12
2.2. Chức năng tế bào T-CD4 trong đáp ứng miễn dịch.....	13
2.3. Đáp ứng miễn dịch trong nhiễm HIV/AIDS.....	16
2.4. Ý nghĩa của xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong theo dõi điều trị HIV/AIDS	17
BÀI 2. NGUYÊN LÝ CƠ BẢN CỦA MÁY ĐẾM TẾ BÀO DÒNG CHẢY (Flow Cytometer)	22
1. Tổng quan về các kỹ thuật dùng trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4..	22
2. Lịch sử về máy đếm tế bào theo nguyên lý dòng chảy.....	23
3. Các bộ phận chính và nguyên lý cơ bản của máy đếm tế bào theo nguyên lý dòng chảy	24
3.1. Hệ thống tạo dòng chất lỏng (fluidics system)	24
3.2. Hệ thống quang học	25
3.3. Hệ thống điện tử (electronics system)	26
4. Cơ chế nhuộm kháng nguyên bề mặt tế bào và quá trình thu nhận tín hiệu.....	27
4.1. Cơ chế nhuộm kháng nguyên bề mặt.....	27
4.2. Quá trình thu nhận tín hiệu	27
5. Ứng dụng của máy đếm tế bào theo nguyên lý dòng chảy	30
5.1. Ứng dụng.....	30
5.2. Đếm tế bào lympho T-CD4 kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy	30
5.3. Quy trình kỹ thuật căn bản cho xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4 bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy.....	32
6. Giới thiệu một số loại máy đếm tế bào T-CD4 tại Việt Nam.....	33
Bài 3. QUẢN LÝ MẪU BỆNH PHẨM CHO XÉT NGHIỆM TẾ BÀO T-CD4	36
1. Lấy mẫu bệnh phẩm.....	36
1.1. Xác định đúng bệnh nhân	36
1.2. Lấy mẫu.....	37
2. Đóng gói, bảo quản và vận chuyển mẫu	37
2.1. Đóng gói và bảo quản mẫu	37
2.2. Vận chuyển mẫu máu.....	38
2.3. Tiếp nhận mẫu máu tại phòng xét nghiệm.....	39
2.4. Lưu giữ mẫu.....	40
2.5. Hủy bỏ mẫu	40
2.6. Trao đổi và chuyển mẫu.....	40
3. Nguyên nhân và giải pháp khắc phục một số lỗi thường gặp.....	40
3.1. Hiện tượng tan huyết.....	40

3.2 Hiện tượng cục máu đông hoặc đông một phần	41
Bài 4. TỔNG QUAN VỀ QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG TRONG ĐẾM TẾ BÀO T-CD4	44
1. Các khái niệm.....	44
2. Yêu cầu về quản lý chất lượng.....	44
2.1. Tổ chức và quản lý.....	45
2.2. Các tiêu chuẩn chất lượng.....	45
2.3. Tài liệu	45
2.4. Giám sát và đánh giá.....	46
2.5. Tập huấn.....	46
3. Yêu cầu về kỹ thuật:.....	46
Bài 5. KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG TRONG XÉT NGHIỆM ĐẾM TẾ BÀO T-CD4	51
1. Các khái niệm.....	51
1.1. Kiểm soát chất lượng:	51
1.2. Kiểm soát chất lượng nội bộ hay nội kiểm tra (Internal Quality Control-IQC):.....	51
2. Những yếu tố ảnh hưởng tới xét nghiệm đếm tế bào T-CD4	51
3. Quy trình kiểm soát chất lượng nội bộ	52
3.1. Vẽ biểu đồ Levey-Jennings.....	52
3.2. Phân tích mẫu chuẩn máy và mẫu kiểm chứng	53
3.3. Phân tích kết quả.....	54
3.4. Các nguyên nhân gây ra lỗi.....	59
4. Đánh giá chất lượng bên ngoài (EQA) hay ngoại kiểm tra	59
4.1. Giới thiệu	59
4.2 Quy trình thực hiện mẫu ngoại kiểm tra (EQA)	60
Bài 6. QUẢN LÝ THÔNG TIN VÀ HỆ THỐNG BIỂU MẪU BÁO CÁO TRONG XÉT NGHIỆM ĐẾM TẾ BÀO T-CD4.....	63
1. Khái niệm thông tin và tầm quan trọng của thông tin trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4.....	63
1.1. Khái niệm.....	63
1.2. Tầm quan trọng thông tin trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 ...	63
2. Các loại thông tin và yêu cầu đối với thông tin trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4.....	64
2.1. Các loại thông tin.....	64
2.2. Những yêu cầu đối với thông tin về xét nghiệm T-CD4	64
2.3 Các giai đoạn thu thập thông tin trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4	64
3. Hệ thống biểu mẫu báo cáo.....	65
3.1. Sổ xét nghiệm T-CD4	65
3.2. Sổ ghi chép vận chuyển mẫu	66
3.3. Sổ theo dõi lý lịch máy	66
3.4. Báo cáo tình hình xét nghiệm	68
3.5. Phiếu theo dõi nhiệt độ	69
3.6. Hồ sơ theo dõi nội kiểm (IQC), ngoại kiểm tra (EQA)	69

4. Chế độ lưu giữ thông tin	69
Bài 7. AN TOÀN SINH HỌC TRONG XÉT NGHIỆM ĐẾM TẾ BÀO T-CD4	72
1. Hướng dẫn an toàn trong quá trình lấy mẫu và vận chuyển	72
1.1. Mục đích	72
1.2. Nguyên tắc an toàn đối với nhân viên lấy máu.....	72
1.3. Dụng cụ an toàn cho người vận chuyển mẫu.....	73
2. Bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm	74
2.1. Nguyên tắc chung về an toàn sinh học	74
2.2. Yêu cầu đối với nhân viên phòng xét nghiệm đếm tế bào T-CD4	75
3. Sự cố an toàn sinh học	76
3.1. Xử lý sự cố bị vật sắc nhọn đâm vào tay trong khi làm việc với tác nhân gây bệnh:	76
3.2. Xử lý sự cố làm đổ dung dịch chứa tác nhân gây bệnh trong tủ an toàn sinh học	77
3.3. Xử lý sự cố đổ dung dịch chứa tác nhân gây bệnh lên sàn nhà, bàn xét nghiệm hoặc trong quá trình vận chuyển.....	77
4. An toàn hóa học, lửa, điện, bức xạ và trang thiết bị	78
5. Quản lý mẫu bệnh phẩm	79
6. Xử lý rác thải.....	79
7. Quy chuẩn kỹ thuật về an toàn sinh học phòng xét nghiệm	79
8. Tổ chức quản lý.....	79
9. Thực hành tốt trong phòng xét nghiệm.....	80
9.1 Yêu cầu về an toàn sinh học	80
9.2 Yêu cầu về kỹ năng thực hành của phòng xét nghiệm	80
10. Xử trí sau phơi nhiễm với HIV	81
10.1 Các dạng phơi nhiễm	81
10.2 Quy trình xử trí sau phơi nhiễm:.....	81
PHỤ LỤC: QUY TRÌNH KỸ THUẬT ĐỐI VỚI CÁC HỆ THỐNG MÁY	86
I. Quy trình đếm tế bào T-CD4 trên máy FACSCALIBUR	86
II. Quy trình đếm tế bào T-CD4 trên máy CYFLOW SL3.....	93
III. Quy trình đếm tế bào T-CD4 trên máy FACSCOUNT	105
IV. Quy trình đếm tế bào T-CD4 trên máy PCA-GUAVA	123
V. Quy trình đếm tế bào T-CD4 trên máy PIMA	129
VI. Quy trình hướng dẫn lấy máu thực hiện xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trên máy PIMA.....	139
ĐÁP ÁN	145
TÀI LIỆU THAM KHẢO	148

LỜI GIỚI THIỆU

Số lượng tế bào Lympho T-CD4 (tế bào Lympho T có thụ thể CD4 gọi tắt là tế bào T-CD4) trong mẫu máu của người có ý nghĩa quan trọng đối với việc xác định tình trạng miễn dịch. Đặc biệt, đối với người nhiễm HIV, việc xác định số lượng tế bào T-CD4 có ý nghĩa quan trọng trong việc xác định tình trạng suy giảm miễn dịch của bệnh nhân, quyết định thời điểm bắt đầu điều trị cũng như theo dõi hiệu quả hoặc thất bại điều trị của thuốc kháng HIV. Trong những năm qua, xét nghiệm xác định số lượng tế bào T-CD4 cho bệnh nhân trước và trong quá trình điều trị đã trở thành một phần quan trọng trong việc hỗ trợ theo dõi điều trị cho bệnh nhân HIV/AIDS. Do vậy, việc cung cấp kết quả xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 chính xác, kịp thời là rất cần thiết cho việc chăm sóc, điều trị hiệu quả cho bệnh nhân.

Tài liệu được xây dựng với mục đích nâng cao nhận thức và kỹ năng xét nghiệm cho học viên, cán bộ y tế làm về lĩnh vực phòng, chống HIV/AIDS và những người quan tâm tới hoạt động xét nghiệm đếm tế bào T-CD4. Ngoài ra tài liệu còn được sử dụng cho việc đào tạo cấp chứng chỉ cho học viên. Tài liệu “Xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong điều trị HIV/AIDS” đề cập tới các nội dung như: Vai trò tế bào T-CD4 trong nhiễm HIV/AIDS, Nguyên lý cơ bản của máy đếm tế bào dòng chảy, Quản lý mẫu bệnh phẩm cho xét nghiệm đếm tế bào T-CD4, Tổng quan về quản lý chất lượng trong đếm tế bào T-CD4, Kiểm soát chất lượng trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4, Quản lý thông tin và biểu mẫu báo cáo trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4, An toàn sinh học trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4.

Tài liệu đã tham khảo các tư liệu quý báu của các nước trên thế giới và trong khu vực, của một số trường đại học, tổ chức quốc tế đồng thời dựa trên tình hình thực tế của Việt Nam để biên soạn phù hợp với thực tiễn tại Việt Nam. Bên cạnh đó nhóm biên soạn cũng nhận được các chia sẻ và góp ý quý báu của các chuyên gia đầu ngành trong và ngoài nước, cán bộ có kinh nghiệm của các Viện, Bệnh viện và những người trực tiếp thực hiện chương trình xét nghiệm từ Trung ương đến địa phương.

Trong quá trình biên soạn, không thể tránh khỏi các sai sót, tập thể các tác giả rất mong nhận được sự đóng góp của quý độc giả để tài liệu tiếp tục được hoàn thiện hơn.

THỨ TRƯỞNG BỘ Y TẾ



PGS. TS. Nguyễn Thanh Long

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG TÀI LIỆU

1. Mục đích của cuốn tài liệu

Cuốn tài liệu Xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong điều trị HIV/AIDS nhằm mục đích cung cấp cho giảng viên, học viên, cán bộ y tế và những người quan tâm tới hoạt động xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 nâng cao các kiến thức và kỹ năng về xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong theo dõi điều trị HIV/AIDS, đảm bảo chất lượng và an toàn sinh học phòng xét nghiệm. Ngoài ra, cuốn tài liệu này sẽ được sử dụng làm căn cứ cho việc đào tạo cấp chứng chỉ hành nghề đối với cán bộ xét nghiệm.

2. Đối tượng sử dụng tài liệu

Cuốn tài liệu này được biên soạn chủ yếu dành cho:

- Cán bộ phòng xét nghiệm;
- Cán bộ quản lý phòng xét nghiệm;
- Cán bộ chăm sóc điều trị HIV/AIDS tại các Bệnh viện Đa khoa, Viện và các Bệnh viện Trung ương;
- Những người quan tâm tới hoạt động xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 nhằm nâng cao các kiến thức và kỹ năng về xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong theo dõi điều trị HIV/AIDS.

3. Nội dung chủ yếu của tài liệu

Tài liệu này bao gồm 07 bài, Phụ lục các quy trình thực hiện xét nghiệm trên các dòng máy xét nghiệm đếm tế bào T-CD4, câu hỏi lượng giá và đáp án, tài liệu tham khảo. Trong đó 01 bài giới thiệu về vai trò của tế bào T-CD4 trong đáp ứng miễn dịch, 01 bài giới thiệu về nguyên lý cơ bản của máy đếm tế bào T-CD4, 01 bài giới thiệu về thu thập và quản lý mẫu bệnh phẩm, 02 bài đề cập tới quản lý chất lượng xét nghiệm, 01 bài đề cập tới quản lý thông tin và hệ thống biểu mẫu báo cáo, 01 bài đề cập về an toàn sinh học trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4.

4. Tài liệu tham khảo

Phần này tập hợp những tài liệu cơ bản nhất mà nhóm biên soạn đã sử dụng trong quá trình biên soạn và một số văn bản quy phạm pháp luật có liên quan đến xét nghiệm đếm tế bào T-CD4, thu thập và quản lý mẫu bệnh phẩm, an toàn phòng xét nghiệm.

5. Cách sử dụng tài liệu

Đây là cuốn tài liệu được sử dụng đào tạo liên tục cho cán bộ y tế tham gia vào hoạt động xét nghiệm đếm tế bào T-CD4. Tuy nhiên, các bác sỹ và những người

làm công tác quản lý cũng có thể tham khảo giúp nâng cao kiến thức về xét nghiệm đếm tế bào T-CD4.

Với những người quản lý hoạt động xét nghiệm đếm tế bào T-CD4, tài liệu này sẽ được sử dụng như là nguồn tham khảo trong quá trình tham mưu xây dựng các chính sách, văn bản chỉ đạo, kế hoạch của đơn vị về triển khai hoạt động xét nghiệm đếm tế bào T-CD4.

Người quản lý cũng có thể sử dụng tài liệu này như một hướng dẫn chuyên môn phục vụ cho công tác theo dõi, giám sát và đánh giá các hoạt động xét nghiệm HIV nói chung và xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 nói riêng triển khai trên địa bàn quản lý.

Lưu ý rằng, trong quá trình sử dụng, một số nội dung, kiến thức trong tài liệu này có thể thay đổi do sự tiến bộ về kỹ thuật xét nghiệm, và các quy định có liên quan. Do vậy, người sử dụng tài liệu, đặc biệt là các giảng viên cần chú ý cập nhật thường xuyên.

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

ADN	Acid Desoxyribonucleic
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome - Hội chứng Suy giảm Miễn dịch Mắc phải
APC	Antigen Presenting Cell - Tế bào trình diện kháng nguyên
ARN	Acid Ribonucleic
ARV	Antiretrovirus – Thuốc kháng retrovirus.
BD	Becton & Dickinson
BYT	Bộ Y tế
CD	Cluster of Differentiation – Cụm biệt hóa
EDTA	Ethylene Di-amine Tetra Acetate
EQA	External Quality Assessment – Ngoại kiểm tra
HIV	Human Immunodeficiency Virus – Vi rút gây Suy giảm Miễn dịch ở người
HSC	Hematopoietic Stem Cell – Tế bào gốc sinh máu
IQC	Internal Quality Control – Nội kiểm tra
LPC	Lymphoid Progenitor Cell – Tế bào gốc định hướng dòng Lympho
MHC	Major Histocompatibility Complex – Phức hợp hòa hợp mô chủ yếu
MPC	Myeloid Progenitor Cell – Tế bào gốc định hướng dòng tủy
OPC	Out Patient Clinic – Phòng khám ngoại trú
PAC	Prevention of HIV/AIDS Center – Trung tâm Phòng, chống HIV/AIDS
QASI	Quality Assessment and Standardization for Immunological Measure – Đánh giá chất lượng và chuẩn hóa đối với kỹ thuật miễn dịch
QC	Quality Control – Kiểm soát chất lượng
QMS	Quality Management System – Hệ thống quản lý chất lượng
SD	Standard Deviation – Độ lệch chuẩn
TCR	T Cell Receptor – Thụ thể tế bào T
TDTH	Delayed Type Hypersensitivity T Cell – Tế bào Lympho T gây quá mẫn muộn

BÀI 1. VAI TRÒ TẾ BÀO T-CD4 TRONG NHIỄM HIV/AIDS

Mục tiêu bài học

Sau khi học xong bài này, học viên có thể trình bày được:

1. Nguồn gốc của tế bào T-CD4.
2. Chức năng của tế bào T-CD4 trong đáp ứng miễn dịch.
3. Ý nghĩa của xét nghiệm tế bào T-CD4 trong theo dõi và điều trị HIV/AIDS.

Thời gian học tập: 180 phút

Nội dung bài học:

1. Thông tin cơ bản về HIV/AIDS

Tháng 6 năm 1981, lần đầu tiên loài người biết đến một căn bệnh lạ trên thế giới, đó là Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người (AIDS). Kể từ đó đến nay, nhiễm HIV/AIDS được coi là đại dịch và là thảm họa của nhân loại bởi tốc độ lây truyền rất nhanh và rộng khắp. Hiện nay, chưa có vắc xin để dự phòng lây nhiễm HIV và cũng chưa có thuốc điều trị khỏi AIDS và do vậy tỷ lệ tử vong do AIDS là rất cao.

HIV (Human Immunodeficiency Virus) là vi rút gây ra Hội chứng Suy giảm Miễn dịch Mắc phải ở người, làm cho cơ thể suy giảm khả năng chống lại các tác nhân gây bệnh.

AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) là Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người do HIV gây ra, thường được biểu hiện thông qua các nhiễm trùng cơ hội, các ung thư và có thể dẫn đến tử vong. Đây là giai đoạn cuối cùng của nhiễm HIV.

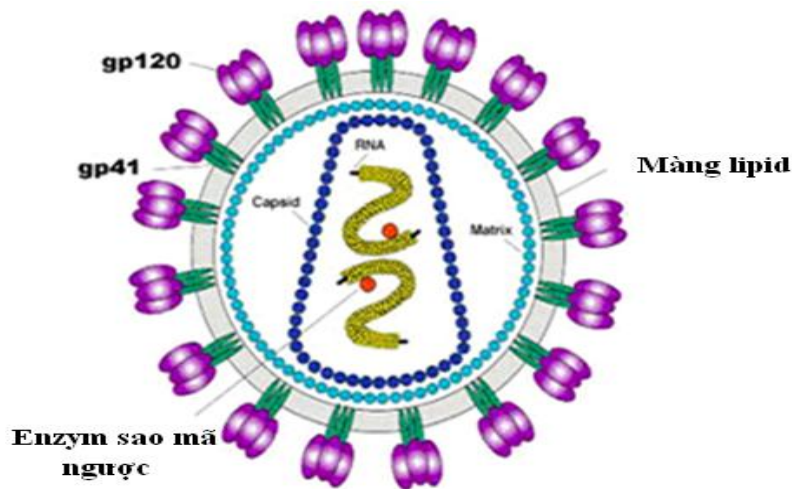
Một người khi bị nhiễm HIV sẽ trở thành nguồn lây nhiễm suốt đời cho người khác. Hầu hết những người nhiễm HIV đều không có các dấu hiệu và triệu chứng của bệnh trong thời gian dài và có thể không biết rằng mình đã bị nhiễm bệnh, tuy nhiên họ vẫn có thể làm lây truyền vi rút cho những người khác.

HIV được xếp vào phân nhóm Lenti vi rút thuộc họ Retro vi rút. Người ta đã phân lập được hai thể khác nhau về di truyền nhưng có liên quan với nhau là HIV-1 và HIV-2.

Về cấu trúc, HIV có dạng hình cầu, đường kính 100-120 nm gồm 3 lớp:

- Lớp vỏ ngoài: Là một màng lipid kép, gắn trên màng này là các gai nhú, bản chất là các phân tử glycoprotein, phân tử này có hai phần là gp120 và gp41, các phân tử này có ái tính gắn rất cao với các phân tử CD4. Qua đó, vi rút có thể

bám và xâm nhập vào tế bào đích có thụ thể CD4 (lympho T hỗ trợ, bạch cầu đơn nhân, các đại thực bào...).



Hình 1. Cấu trúc HIV

- Lớp vỏ trong: Gồm 2 lớp protein có trọng lượng phân tử là 17 kilodalton (p17) và 24 kilodalton (p24).

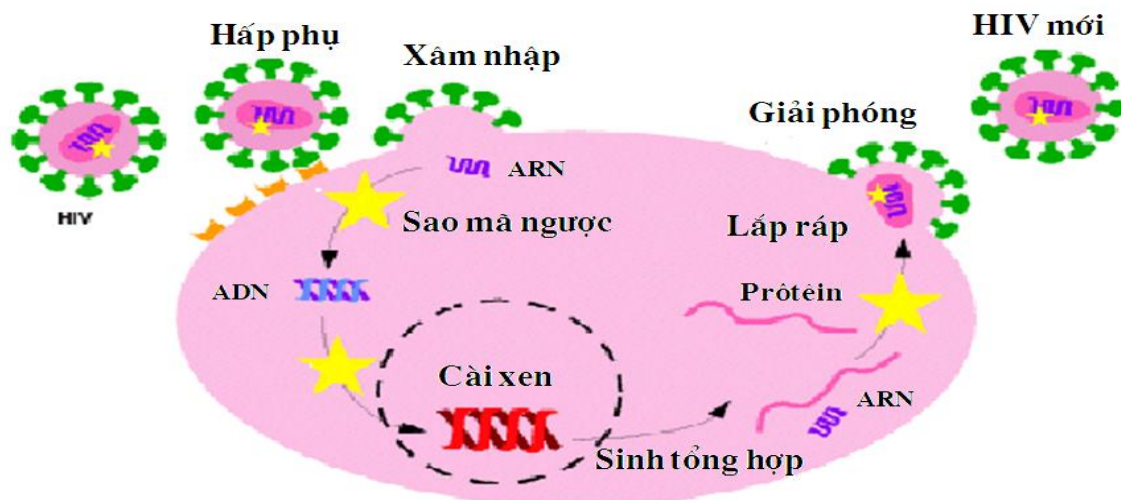
- Lớp lõi: Gồm bộ gen có 2 chuỗi ARN gắn enzym phiên mã ngược RT (reverse transcriptase), enzym này sẽ biến đổi mã gen của HIV là ARN thành ADN. Enzym integrase (men tích hợp) giúp cho ADN của HIV được gắn vào trong ADN của tế bào bị nhiễm. Ngoài ra còn có enzym protease (men thủy phân protein) có tác dụng cắt các polyprotein được mã hóa thành các protein cấu trúc hoặc chức năng, tổng hợp thành một vi rút đầy đủ.

Về vòng đời của HIV khi xâm nhập vào cơ thể người:

- Vi rút gắn lên bề mặt tế bào: HIV gắn vào bề mặt tế bào đích nhờ sự liên kết đặc biệt giữa phân tử gp120 với các thụ thể CD4 và các đồng thụ thể khác. Các tế bào đích là những tế bào có các thụ thể CD4 trên bề mặt (tế bào lympho T hỗ trợ, bạch cầu đơn nhân (monocyte), đại thực bào (macrophage), tế bào tua gai (dendritic cell), tế bào thần kinh đệm...). Tuy nhiên, tế bào T-CD4 vẫn là mục tiêu chính bởi tế bào này có rất nhiều thụ thể CD4, hơn hẳn các loại tế bào khác. Mặt khác, tế bào T-CD4 được quan tâm nhiều hơn do nó có vai trò “nhạc trưởng” trong đáp ứng miễn dịch của cơ thể do vậy sự suy giảm T-CD4 thường đồng hành với tình trạng suy giảm miễn dịch và nhiễm trùng cơ hội.

- Vi rút xâm nhập tế bào: Sau khi bám vào tế bào đích, phân tử protein gp41 của vi rút cắm vào màng tế bào tạo nên hiện tượng hòa màng. Sau đó, bộ gen và enzym của HIV giải phóng vào trong tế bào.

- Vi rút nhân lên trong tế bào: Nhờ men sao chép ngược, ADN chuỗi kép của HIV được tạo thành từ khuôn mẫu ARN của nó. Sau khi được tổng hợp, ADN kép chui vào nhân tế bào đích, tích hợp vào ADN tế bào nhờ men integrase. Nhờ vậy, HIV đã tránh được sự phát hiện của hệ thống bảo vệ (hệ thống miễn dịch) của cơ thể cũng như tránh được tác dụng trực tiếp của thuốc.



Hình 2: Vòng đời của vi rút

Khi vi rút xâm nhập tế bào, có hai khả năng xảy ra:

- Vi rút “ngủ ” trong tế bào nhiễm, đây là giai đoạn không triệu chứng. Các tế bào T-CD4 bị nhiễm vi rút vẫn có thể lây cho người khác. Vi rút gây nhiễm các hạch bạch huyết và các đại thực bào.

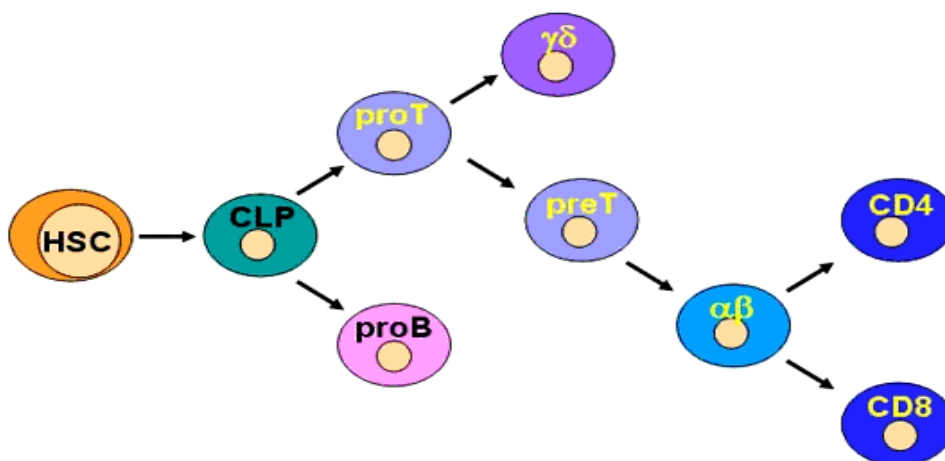
- Khi vi rút kết hợp được với tế bào T-CD4, nó gắn ADN của nó vào ADN của tế bào. Vì vậy, khi T-CD4 hoạt hóa, nó vô tình trở thành một nhà máy sản xuất HIV. Các vi rút mới được tạo ra sẽ phá vỡ tế bào (đây là cơ chế chính gây giảm tế bào lympho T-CD4 ở người nhiễm HIV), đồng thời khi ra khỏi tế bào sẽ tiếp tục gây nhiễm các tế bào lành khác.

2. Vai trò tế bào T-CD4 trong đáp ứng miễn dịch

2.1. Nguồn gốc và quá trình phát triển của tế bào T-CD4

Tế bào gốc sinh máu (HSC - Hematopoietic Stem Cell) trong tủy xương sinh ra tế bào gốc định hướng dòng lympho (LPC - Lymphocytic Progenitor Cell) và dòng tủy (MPC - Myeloid Progenitor Cell). Từ tế bào gốc định hướng dòng

lympho chúng lại phân chia thành hai nhóm chính: tế bào B (B progenitor - pro B) và T (T progenitor - pro T). Tế bào B progenitor và T progenitor tiếp tục biệt hóa thành các tế bào lympho trưởng thành (lympho B, tương bào, lympho T-CD4, lympho T-CD8) để thực hiện các chức năng sống riêng biệt.



Hình 3. Nguồn gốc tế bào T-CD4 và T-CD8

Khi qua tuyến ức, lympho T bị giữ lại nhờ sức hoá ứng động rất lớn của chất thymotaxin do chính tuyến ức tiết ra. Thoạt đầu nó “định cư” ở vùng vỏ tuyến ức, được sinh sản, biệt hoá và trưởng thành tại đây sau đó di cư vào vùng tủy tuyến ức, tiếp tục chín và tung ra máu để “định cư” lần 2 ở các cơ quan bạch huyết (hạch, lách, niêm mạc...).

Trong quá trình phát triển, các tế bào lympho T có nhiều sự thay đổi về dấu ấn màng và thụ thể bề mặt, tạo ra hai nhóm tế bào T: $\alpha\beta$ -T và $\gamma\delta$ -T. Khi rời tuyến ức, chúng có tới trên 80% là cặp gen $\alpha\beta$ -T, các cặp gen $\gamma\delta$ -T rất ít (dưới 20%). Sau đó, $\alpha\beta$ -T tạo ra hai dưới nhóm T-CD4 và T-CD8 tại tuyến ức T-CD4 và T-CD8 có chức năng khác nhau nhưng liên quan với nhau rất mật thiết, tuy nhiên T-CD4 đóng vai trò quyết định chi phối toàn bộ hoạt động của các tế bào miễn dịch.

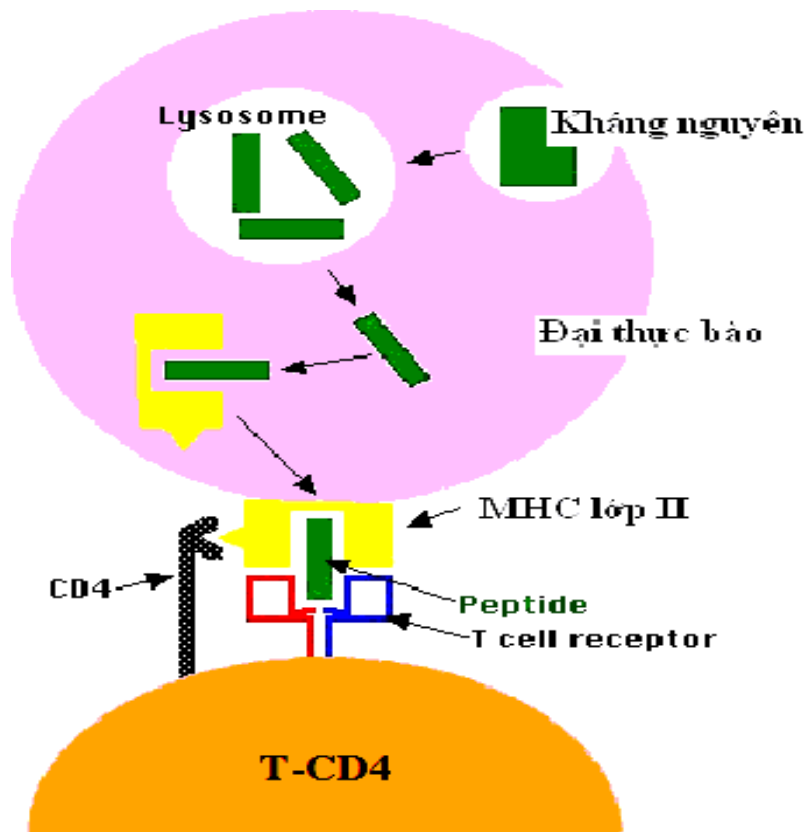
2.2. Chức năng tế bào T-CD4 trong đáp ứng miễn dịch

Tế bào T-CD4 là một phân nhóm quan trọng nhất của tế bào lympho T. Chức năng chính của nó là nhận biết kháng nguyên lạ và điều hòa hệ thống miễn dịch của cơ thể.

2.2.1. Chức năng nhận biết kháng nguyên

Tế bào T-CD4 có vai trò quan trọng bậc nhất trong nhận biết kháng nguyên lạ (kháng nguyên ngoại sinh). Khi các kháng nguyên này xâm nhập vào cơ thể, hầu hết bị đại thực bào bắt giữ, cắt thành những mảnh peptid thẳng và hiện lên bề

mặt tế bào nhờ các phân tử MHC lớp II. Phân tử này được gắn kết đặc hiệu với phân tử CD4 trên bề mặt tế bào T-CD4 nên các thụ thể của T-CD4 (TCR) mới có điều kiện nhận diện kháng nguyên (mảnh peptid) do MHC lớp II trình ra bề mặt đại thực bào. Khi có sự nhận diện kháng nguyên ngoại lai thông qua phức hợp TCR-HLA lớp II-peptid lạ sẽ tạo sự khuếch đại tương tác hai chiều giữa đại thực bào và tế bào lympho T-CD4. Đại thực bào tiết ra IL-1 để hoạt hóa T-CD4. T-CD4 đã được hoạt hóa sẽ tiết IFN- γ kích thích ngược lại làm cho đại thực bào trở thành các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) tốt hơn.



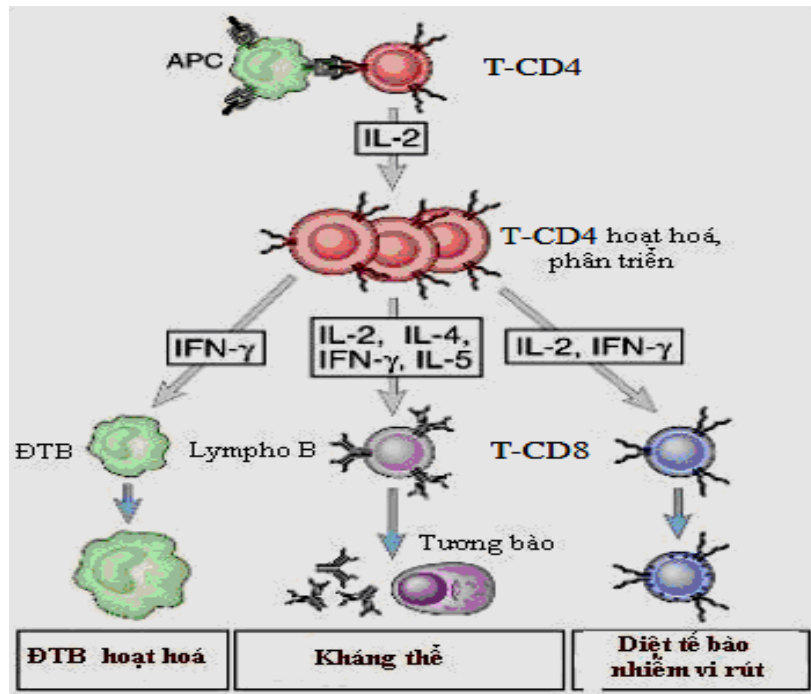
Hình 4. Cơ chế nhận biết kháng nguyên của tế bào T-CD4

Các kháng nguyên nội sinh (bản chất là các peptide bất thường được tổng hợp bởi các tế bào của cơ thể bị nhiễm vi rút hoặc từ các tế bào của cơ thể bị ung thư) được nhận diện bởi tế bào T-CD8 thông qua phân tử MHC lớp I. Nhưng lúc này, T-CD8 chưa có khả năng loại trừ ngay kháng nguyên mới nhận diện mà còn phải chờ sự “giúp đỡ” từ tế bào T-CD4 hoạt hóa thì mới phát huy được khả năng “tiêu diệt” tế bào đích của mình.

Tóm lại, khi có kháng nguyên vào cơ thể, tùy theo bản chất kháng nguyên mà có các loại tế bào nhận diện khác nhau như đại thực bào, tế bào T-CD4, T-CD8, lympho B... Tuy nhiên, tất cả chỉ dừng lại ở bước nhận diện, chưa thể có đáp ứng miễn dịch xảy ra nếu không có sự tương tác từ tế bào T-CD4 hoạt hóa.

2.2.2. Chức năng điều hòa miễn dịch

Đây là giai đoạn diễn ra ngay sau khi nhận biết kháng nguyên. Sự hoạt hóa của tế bào T-CD4 thể hiện ở chỗ, các cytokin IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ ... mà nó tiết ra tác động lên một loạt các tế bào khác, mà trước hết là lên bản thân T-CD4, rồi T-CD8, lympho B, TDTH...(hình 5). Kết quả là các tế bào T-CD4 phát triển mạnh mẽ; các đại thực bào, tế bào lympho B, tế bào T-CD8, tế bào NK được hoạt hóa và đồng loạt trở thành các tế bào thực thi (effector cell). Đại thực bào hoạt hóa sẽ có khả năng thực bào và trình diện kháng nguyên tốt hơn. Tế bào lympho B dưới tác dụng của IL-2, IL-4, IL-5 sẽ hoạt hóa thành các tương bào sinh kháng thể tham gia đáp ứng miễn dịch dịch thể chống lại vi khuẩn xâm nhập. Tế bào T-CD8 được hoạt hóa bởi IL-2 và IFN- γ do T-CD4 tiết ra sẽ có khả năng tiêu diệt tế bào đích, là những tế bào bị nhiễm vi rút hay tế bào ung thư.



Hình 5. Vai trò của tế bào T-CD4 trong điều hòa miễn dịch

Trong điều kiện sinh lý bình thường, các tế bào T-CD4 sẽ điều khiển và chi phối hoạt động miễn dịch một cách hiệu quả nhất làm cho cơ thể luôn ở trạng thái cân bằng. Tế bào T-CD4 tiết ra các cytokin thích hợp giúp cho sự sinh sản đủ mức của các tế bào thực thi, giúp chúng hoạt hóa vừa đủ để loại trừ kháng nguyên. Sự hoạt hóa của T-CD4 sẽ được kiểm soát (kìm hãm hoặc tăng cường) nhờ chính các sản phẩm và hiệu quả của tế bào thực thi. Ví dụ khi lượng kháng thể đủ cao, lượng TNF đủ lớn... sẽ có hiện tượng ức chế ngược kìm hãm sự tăng tiết quá mức. Như vậy, chúng ta thấy rõ một điều là tế bào T-CD4 đóng vai trò trung tâm trong đáp ứng miễn dịch của cơ thể. Vì một bệnh lý nào đó mà T-CD4 bị thiếu hụt sẽ ảnh hưởng nghiêm trọng không những chỉ ở đáp ứng miễn dịch tế

bào mà còn cả đáp ứng miễn dịch dịch thể, hậu quả làm cho cơ thể không có sức chống đỡ bệnh tật và do đó dễ mắc các bệnh nhiễm trùng cơ hội hay ung thư mà điển hình nhất đó là trong trường hợp nhiễm HIV/AIDS.

2.3. Đáp ứng miễn dịch trong nhiễm HIV/AIDS

Do hướng tính đặc hiệu của gp120 HIV đối với thụ thể CD4 và thụ thể CD4 có nhiều trên các tế bào T-CD4, một tế bào đóng vai trò trung tâm của hầu hết các đáp ứng miễn dịch nên nhiễm HIV có ảnh hưởng rất lớn lên hệ thống miễn dịch. HIV làm ly giải các tế bào T-CD4 hoặc bất hoạt chức năng của tế bào này dẫn đến hệ thống miễn dịch của cơ thể suy giảm khả năng nhận diện kháng nguyên lạ (thông qua tương tác giữa T-CD4 với MHC lớp II) hoặc có nhận diện được kháng nguyên lạ nhưng T-CD4 không phát huy được vai trò “nhạc trưởng” hỗ trợ các tế bào có thẩm quyền miễn dịch khác thực thi vai trò bảo vệ hữu hiệu.

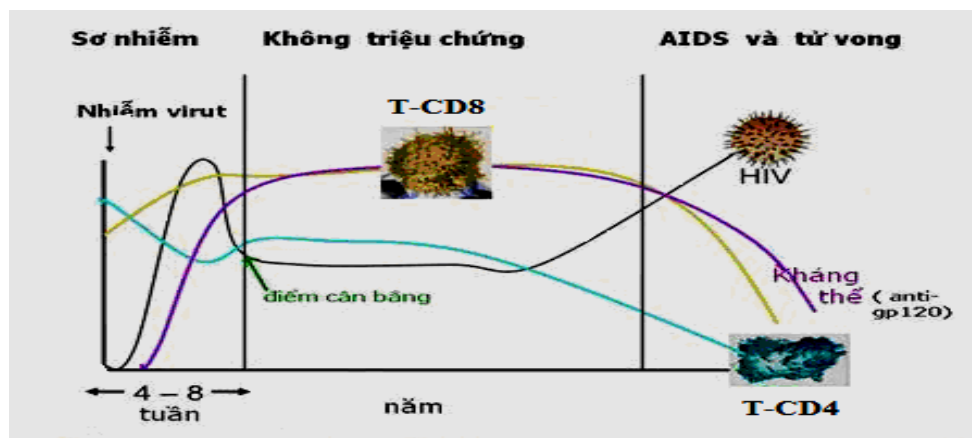
Sau khi HIV gắn với thụ thể CD4 thì xảy ra hiện tượng hòa màng rồi xâm nhập và phát triển trong tế bào của vật chủ. Khi tế bào T-CD4 hoạt hóa tăng sinh thì đồng thời các HIV mới cũng song song được tạo ra bởi ADN của vi rút được gắn vào ADN của tế bào T-CD4. Các tế bào bị nhiễm HIV sẽ gây nhiễm cho các tế bào lành khác bằng nhiều cách khác nhau. Sau khi bị nhiễm HIV, các vi rút mới tổng hợp được giải phóng ra sẽ đến gắn vào các thụ thể CD4 của các tế bào lành khác rồi xâm nhập và diễn biến như trên. Phân tử gp120 được tổng hợp trong tế bào bị nhiễm HIV di chuyển ra bề mặt và gắn với thụ thể CD4 trên bề mặt tế bào lành gần đó, tạo nên các hợp bào. Hợp bào bị thay đổi tính chất, không còn chức năng của tế bào bình thường và sau đó sẽ bị vỡ. Vì vậy không chỉ những tế bào bị nhiễm HIV mà cả các tế bào lành khác cũng bị ảnh hưởng một cách nghiêm trọng.

Đại thực bào, tế bào lympho B, tế bào tua gai... cũng bị HIV tấn công và hủy diệt bởi trên nó cũng có các thụ thể CD4. Do đó, phần nào quá trình tương tác và trình diện kháng nguyên, khâu mở đầu của đáp ứng miễn dịch không thực hiện được. Tế bào T-CD4 không được hoạt hóa, không nhận diện được kháng nguyên và vì thế mà không sản xuất được các cytokin để kích thích hoạt hóa các tế bào miễn dịch khác. Hậu quả là các tế bào lympho B được hoạt hóa sinh kháng thể một cách yếu ớt, các tế bào T-CD8 (tế bào miễn dịch có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch chống virus) cũng không được hoạt hóa hoặc hoạt hóa không đầy đủ nên không tiêu diệt được vi rút. Nhìn chung, T-CD4 bị giảm số lượng, giảm chức năng, đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch tế bào cũng vì vậy mà giảm sút, hệ thống miễn dịch suy giảm không có khả năng chống đỡ bệnh tật. Trong nhiễm HIV/AIDS, bệnh nhân chết không phải do HIV mà do vi rút này hủy hoại hệ thống miễn dịch gây suy giảm miễn dịch nên bệnh nhân sẽ chết do nhiễm trùng cơ hội và ung thư. Tóm lại, trong số các tế bào có thụ thể CD4, sự biến động T-CD4 có liên quan mật thiết tới khả năng bảo vệ của hệ thống miễn dịch. Do vậy, việc theo dõi T-CD4 rất có giá trị tiên lượng tình trạng miễn dịch của cơ thể.

2.4. Ý nghĩa của xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong theo dõi điều trị HIV/AIDS

2.4.1. Diễn biến bệnh trong nhiễm HIV/AIDS

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), quá trình tiến triển của HIV được chia làm 4 giai đoạn, phụ thuộc vào mức độ suy giảm miễn dịch và các bệnh lý liên quan đến HIV. Nhiễm HIV tiến triển sang AIDS với mức độ và thời gian khác nhau. Trong giai đoạn sơ nhiễm ban đầu, HIV nhân lên một cách nhanh chóng và phá huỷ các tế bào lympho T-CD4, người nhiễm xuất hiện các triệu chứng không điển hình như sốt nhẹ, viêm họng, tiêu chảy... Trong khoảng thời gian tương đối ngắn từ 4-8 tuần, cơ thể người bệnh hình thành các đáp ứng miễn dịch và giúp ngăn chặn sự nhân lên của vi rút. Cuối giai đoạn này có sự phục hồi nhẹ của số lượng tế bào T-CD4 và sự suy giảm nồng độ vi rút tự do trong máu người nhiễm (hình 5). Tiếp theo, người nhiễm sẽ chuyển sang giai đoạn nhiễm mãn tính không triệu chứng trong khoảng 3-7 năm. Trong giai đoạn này số lượng tế bào T-CD4 giảm dần, hệ miễn dịch mất kiểm soát sự nhân lên của vi rút và khả năng chống nhiễm của hệ miễn dịch cũng suy giảm theo. Giai đoạn cuối, khi nhiễm HIV chuyển sang AIDS, bệnh nhân có số lượng tế bào T-CD4 rất thấp (dưới 200 tế bào/mm³) và hầu như không có khả năng chống đỡ các bệnh nhiễm trùng thông thường, cơ thể xuất hiện các bệnh nhiễm trùng cơ hội, ung thư và chính các bệnh này thường là nguyên nhân gây tử vong cho người bệnh.



Hình 6. Diễn biến miễn dịch tương ứng các giai đoạn lâm sàng

Vậy thì khi nào bắt đầu điều trị ARV?

Hiện nay đã có một thuốc điều trị HIV/AIDS (ARV), tác dụng chủ yếu là ngăn chặn hoặc ức chế sự xâm nhập, sự nhân lên của HIV giúp phục hồi hệ thống miễn dịch (số lượng T-CD4 tăng trở lại). Ngoài ra, cần điều trị các bệnh cơ hội và nâng cao thể trạng. “Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị HIV/AIDS” ban hành kèm theo Quyết định số 4139/QĐ-BYT ngày 02/11/2011 và Quyết định số 3003/QĐ-BYT ngày 19/8/2009 của Bộ trưởng Bộ Y tế quy định tiêu chuẩn bắt đầu điều trị ARV cho người bệnh như sau:

- Đối với người lớn: Tiêu chuẩn bắt đầu điều trị ARV:

- + Người nhiễm HIV có số lượng tế bào T-CD4 ≤ 350 tế bào/mm³ không phụ thuộc vào giai đoạn lâm sàng hoặc,
- + Người nhiễm HIV ở giai đoạn lâm sàng 3, 4 không phụ thuộc số lượng tế bào T-CD4.

- Đối với trẻ em: Tiêu chuẩn bắt đầu điều trị bằng ARV ở trẻ em dựa vào tình trạng chẩn đoán nhiễm HIV, lứa tuổi, giai đoạn lâm sàng và giai đoạn miễn dịch của trẻ.

+ Trẻ có chẩn đoán xác định nhiễm HIV:

- Trẻ dưới 24 tháng tuổi: điều trị ARV ngay, không phụ thuộc vào giai đoạn lâm sàng và số lượng tế bào T-CD4.
- Trẻ từ 24 tháng tuổi đến 60 tháng tuổi: điều trị ARV khi:
 - ✓ Trẻ có % tế bào T-CD4 $\leq 25\%$ hoặc số lượng tế bào T-CD4 ≤ 750 tế bào/mm³ không phụ thuộc vào tình trạng lâm sàng.
 - ✓ Hoặc trẻ ở giai đoạn lâm sàng 3, 4 không phụ thuộc số lượng tế bào T-CD4.
- Trẻ từ 60 tháng tuổi trở lên: chỉ định điều trị ARV tương tự như người lớn nhiễm HIV theo quy định tại khoản 2 điều 1 Quyết định số 4139/QĐ-BYT ngày 02/11/2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế về sửa đổi, bổ sung một số nội dung trong “Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị HIV/AIDS” ban hành kèm theo Quyết định số 3003/QĐ-BYT ngày 19/8/2009 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

+ Trẻ dưới 18 tháng tuổi có kết quả chẩn đoán PCR lần 1 dương tính: tiến hành điều trị ARV cho trẻ đồng thời tiếp tục xét nghiệm PCR lần 2. Dừng điều trị ARV nếu trẻ có kết quả chẩn đoán khẳng định nhiễm HIV âm tính.

+ Trẻ dưới 18 tháng tuổi chưa có chẩn đoán xác định nhiễm HIV: thực hiện điều trị ARV khi trẻ được chẩn đoán lâm sàng bệnh HIV/AIDS nặng.

Thất bại điều trị là gì?

- Thất bại lâm sàng:

Xuất hiện mới hoặc tái phát các bệnh lý giai đoạn lâm sàng 4 sau khi điều trị ít nhất 6 tháng

- Thất bại miễn dịch học: Số lượng T-CD4 giảm xuống mức như trước điều trị, hoặc giảm 50% đỉnh T-CD4 cao nhất đã đạt được, hoặc số lượng T-CD4 vẫn ở mức < 100 tế bào/mm³ sau 1 năm.

- Thất bại vi rút học: Có sự nhân lên dai dẳng của vi rút (tải lượng HIV > 5000 bản sao/ml) trong khi bệnh nhân đang được điều trị bằng ARV.

2.4.2. Ý nghĩa của xét nghiệm tế bào T-CD4

Vì tế bào T-CD4 có vai trò đặc biệt quan trọng của hệ thống miễn dịch cơ thể và khi HIV xâm nhập, nó sẽ “hủy diệt” mạnh mẽ tế bào T-CD4 nên để đánh giá được một cách tổng thể hiện trạng của hệ thống miễn dịch cần phải xét nghiệm T-CD4.

Ý nghĩa của xét nghiệm tế bào T-CD4 là:

- Đánh giá mức độ suy giảm miễn dịch và giai đoạn bệnh trong nhiễm HIV.
- Theo dõi diễn tiến bệnh.
- Chỉ định điều trị dự phòng Cotrimoxazole.
- Chỉ định điều trị thuốc kháng vi rút (ARV).
- Theo dõi và đánh giá hiệu quả điều trị.

Hiện nay, theo quy định của Bộ Y tế, bệnh nhân nhiễm HIV/AIDS cần được theo dõi định kỳ bằng xét nghiệm T-CD4 để có chỉ định can thiệp kịp thời.

* Chỉ số tham chiếu tế bào T-CD4 (Thái lan):

- Người lớn:

Xét nghiệm	Số lượng (tế bào/mm ³)
T-CD3	960 - 2430
T-CD4	470 - 1404
T-CD8	360 - 1250
Tỷ lệ T-CD4/T-CD8 (tỷ lệ CD4/CD8)	0,65 – 2,49

- Trẻ em

Tháng tuổi	Số lượng (tế bào/mm ³)	T-CD4% (CD4%)
1 - 5	2600 – 4000	37 - 48
6 - 11	2800 – 4200	33 - 43
12 - 17	2200 – 3200	31 - 38
≥ 18	1900 – 3000	28 - 39

Tuy nhiên số lượng T-CD4 ở người bình thường cũng khác nhau tùy thuộc lứa tuổi, chủng tộc, địa lý, giới tính và cả thời gian lấy máu xét nghiệm. Ở người

lớn, số lượng tuyệt đối của tế bào lympho nói chung và tế bào T-CD4 nói riêng thấp hơn so với trẻ nhỏ và cũng giảm dần theo lứa tuổi. Trong khi đó, tỷ lệ tương đối (T-CD4%) các phân nhóm tế bào lympho và tỷ lệ CD4/CD8 duy trì khá ổn định theo lứa tuổi. Vì thế tại các phòng xét nghiệm thường áp dụng tính số lượng tuyệt đối T-CD4 cho người lớn và tỷ lệ T-CD4% cho trẻ em. Ngoài ra, các yếu tố môi trường và di truyền cũng góp phần vào sự khác biệt giữa các quần thể, chính vì sự khác biệt này nên các phòng xét nghiệm cần thiết lập giới hạn tham chiếu cho T-CD4 và T-CD8 ở cộng đồng khoẻ mạnh tại địa phương.

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

Chọn phương án đúng cho các câu hỏi sau:

1. Nguồn gốc của tế bào T-CD4:
 - a. Tuỷ xương.
 - b. Hạch.
 - c. Tuyến ức.
 - d. Cả 3 trường hợp trên.
2. Tế bào lympho T-CD4 được biệt hoá thành tế bào chín ở đâu?
 - a. Tuỷ xương.
 - b. Hạch.
 - c. Tuyến ức.
 - d. Cả 3 trường hợp trên.
3. Tế bào T-CD4 có các dấu ấn sau trên bề mặt tế bào:
 - a. CD3, CD8.
 - b. CD3, CD4.
 - c. CD4, CD8.
4. Tế bào T-CD4 nhận diện kháng nguyên nhờ phân tử nào?
 - a. MHC lớp I.
 - b. MHC lớp II.
 - c. Cả 2 trường hợp trên.
5. Tế bào T-CD8 nhận diện kháng nguyên nhờ phân tử nào?
 - a. MHC lớp I.
 - b. MHC lớp II.

- c. Cả 2 trường hợp trên.
6. Xét nghiệm T-CD4 dùng để chẩn đoán nhiễm HIV:
- a. Đúng
 - b. Sai
7. Ý nghĩa xét nghiệm tế bào T-CD4 :
- a. Đánh giá mức độ suy giảm miễn dịch và giai đoạn bệnh trong nhiễm HIV.
 - b. Chỉ định điều trị thuốc kháng vi rút.
 - c. Theo dõi hiệu quả điều trị và đánh giá thành công hay thất bại trong điều trị.
 - d. Cả 3 trường hợp trên.
8. Trong phòng xét nghiệm thường sử dụng giá trị nào của xét nghiệm T-CD4 cho quản lý bệnh nhân nhi khoa:
- a. Tỷ lệ %.
 - b. Số lượng tuyệt đối.
 - c. Cả 2 loại trên.

BÀI 2. NGUYÊN LÝ CƠ BẢN CỦA MÁY ĐẾM TẾ BÀO DÒNG CHẢY (Flow Cytometer)

Mục tiêu bài học:

Sau khi học xong bài này, học viên có thể trình bày được:

1. Cấu tạo cơ bản của một máy đếm tế bào theo nguyên lý dòng chảy và nguyên lý hoạt động.
2. Giải thích cơ chế nhuộm kháng nguyên bề mặt tế bào và các thông số thu nhận từ máy đếm tế bào dòng chảy.
3. Các bước cơ bản để đếm tế bào lympho T-CD4 bằng máy đếm tế bào dòng chảy.
4. Giới thiệu một số dòng máy đếm tế bào lympho T-CD4.

Thời gian học tập: 180 phút

Nội dung bài học:

1. Tổng quan về các kỹ thuật dùng trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4

Các xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4 ban đầu được thực hiện bằng cách sử dụng các hạt bi từ và đếm trên kính hiển vi. Trong phương pháp này người ta dùng các hạt bi từ gắn kháng thể kháng CD14 để loại bỏ tế bào mono (có CD4) sau đó dùng các hạt bi từ gắn kháng thể anti-CD4 để thu thập tế bào T-CD4 sau đó đếm số lượng các tế bào này trên kính hiển vi. Tuy giá thành xét nghiệm thấp, nhưng phương pháp này có nhiều điểm hạn chế về thời gian và số lượng mẫu được thực hiện.

Tiếp đến, xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4 dựa trên kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry) ngày càng trở nên phổ biến và cho đến nay phương pháp này được xem như là phương pháp chuẩn mực cho xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4.

Phương pháp đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry) là một phương pháp dùng để phân tích đồng thời các đặc điểm lý hóa của từng tế bào đơn với tốc độ phân tích từ vài trăm đến vài ngàn tế bào trong một giây.



Hình 7. Các loại tế bào có thể phân tích bằng máy đếm tế bào dòng chảy

Phương pháp đếm tế bào dòng chảy là phương pháp có độ tin cậy cao đồng thời có thể thực hiện được một số lượng lớn xét nghiệm trong ngày. Các dòng máy được sử dụng phổ biến tại Việt Nam như FacsCalibur, Cytomics FC500, Partec Cyflow Coulter, FacsCount. Riêng dòng máy Guava PCA, mặc dù cũng sử dụng nguyên lý đo dòng chảy tế bào nhưng có điểm khác biệt là thay vì sử dụng dung dịch tạo dòng bao thì lại sử dụng ống vi mao có tiết diện nhỏ để tạo dòng tế bào đơn.

Ngoài ra, hiện tại ở Việt Nam dòng máy Pima analyzer bắt đầu hiện diện trên thị trường. Đây là dòng máy đếm tế bào lympho T-CD4 có nguyên lý khác với nguyên lý đo dòng chảy tế bào, sử dụng các con chip vi mạch kết hợp với các kỹ thuật phân tích hình ảnh.

Việc triển khai dòng máy đếm tế bào nào tại cơ sở phụ thuộc rất lớn vào các điều kiện như số lượng mẫu, trình độ của kỹ thuật viên thực hiện, điều kiện lấy và vận chuyển mẫu, thời gian, điều kiện bảo trì bảo dưỡng thiết bị... Cho nên, các đơn vị khi triển khai xét nghiệm đếm tế bào lympho T CD4 cần xem xét điều kiện thực tế của đơn vị mình để áp dụng các hệ thống máy phù hợp.

2. Lịch sử về máy đếm tế bào theo nguyên lý dòng chảy

Năm 1969, Lou Herzenberg phát minh ra kỹ thuật phân loại tế bào dựa vào việc sử dụng ánh sáng huỳnh quang (đèn argon) và phát triển thiết bị phân loại tế bào dựa trên kích hoạt huỳnh quang (FACS - Fluorescent Activated Cell Sorter).

Đến năm 1990, Becton Dickinson (BD) tung ra thị trường máy FACSCCount chuyên dụng cho đếm T-CD4, tại thời điểm đó, máy chưa được cấp giấy chứng nhận bởi FDA nhưng hiện nay đã được FDA công nhận. Năm 1996, BD tiếp tục

đưa ra hệ thống FACSCalibur, và sau đó là các dòng máy FACS Canto, FACS Aria hiện đại và đa nhiệm.

Năm 1996, Công ty Guava cũng bắt đầu giới thiệu dòng máy đếm tế bào đầu tiên của hãng.

Năm 1999, Beckman Coulter công bố về dòng máy EPICS XL và năm 2003 cho ra đời dòng máy Cytomics FC500 và sau đó là các dòng máy Navious, Galious và Mo-Flow với các chức năng ngày càng hiện đại và tính đa nhiệm ngày càng cao.

Năm 1998, hãng Partec sản xuất ra máy đếm CyFlow. Và năm 2000, cho ra đời dòng máy CyFlow SL, và sau này có dòng máy đa nhiệm CyFlow Space.

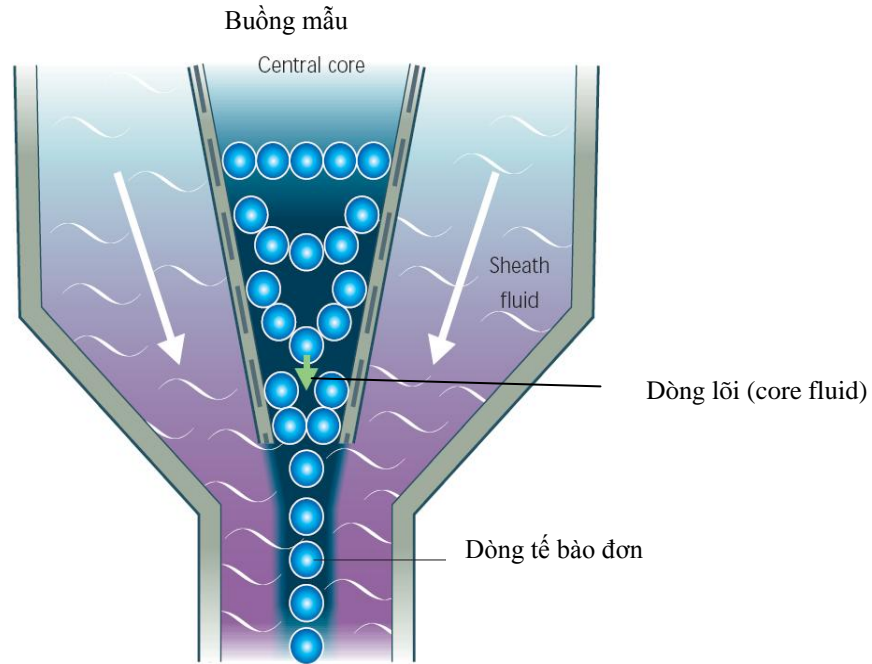
Năm 2002, Guava đưa ra dòng máy PCA.

Năm 2004, Guava cho ra đời dòng máy Guava EasyCD4 chuyên dùng cho đếm tế bào T-CD4.

3. Các bộ phận chính và nguyên lý cơ bản của máy đếm tế bào theo nguyên lý dòng chảy

3.1. Hệ thống tạo dòng chất lỏng (fluidics system)

Hệ thống tạo dòng chất lỏng là bộ phận căn bản nhất của một máy đếm tế bào dòng chảy. Hệ thống tạo dòng chất lỏng gồm có 2 vùng chất lỏng có áp lực khác nhau. Dòng dịch lỏng bên ngoài (sheath fluid) còn được gọi là dung dịch tạo dòng bao: có tác dụng “nấn chỉnh” dòng dịch lỏng chứa mẫu bên trong (core fluid) còn gọi là dòng lõi thành một dòng hẹp tới mức các tế bào/hạt vật chất trong mẫu chỉ có thể đi qua khe hẹp đó từng cái một từ đó giúp tập trung tế bào/vật thể nhỏ có trong mẫu thành dòng tế bào đơn và vận chuyển dòng tế bào đơn này đi qua hệ thống quang học với tốc độ rất cao, khoảng 1000 tế bào/giây. Điều chỉnh mức độ chênh lệch áp lực giữa dòng bao và dòng lõi có thể mở rộng hoặc thu hẹp tiết diện dòng lõi, phù hợp với yêu cầu phân tích (ví dụ phân tích tế bào máu thì cần dòng lõi lớn, phân tích ADN thì cần dòng lõi hẹp). Nhờ cơ chế này hệ thống mới có thể phân tích đồng thời nhiều đặc tính trên từng tế bào một cách chính xác, giảm được yếu tố nhiễu. Dịch dùng tạo dòng sheath thường phải đáp ứng 2 yêu cầu: (1) không gây ảnh hưởng tới tế bào (không làm tan tế bào); và (2) không ảnh hưởng đến độ chiết quang và độ huỳnh quang của hệ thống. Ở một số dòng máy người ta sử dụng ống vi mao thay thế cho dòng bao.

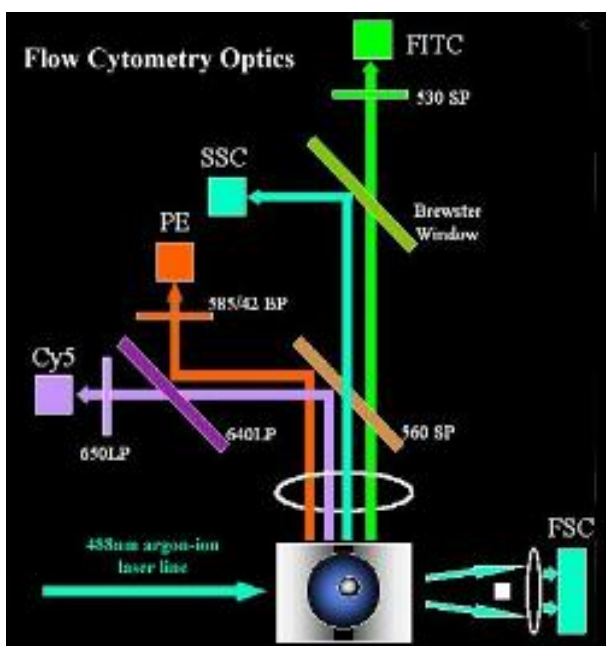


Hình 8. Hệ thống dòng chất lỏng trong buồng mẫu (flow cell)

3.2. Hệ thống quang học

Bao gồm nguồn phát tia sáng (thường là các đèn laser hoặc đèn hồ quang), hệ thống kính lọc và các kênh thu tín hiệu quang học và tính hiệu huỳnh quang (FSC – Forward Scatter Chanel, dùng thu nhận tín hiệu ánh sáng tán xạ góc thẳng; SSC – Side Scatter Chanel, dùng thu nhận tín hiệu ánh sáng tán xạ góc bên, các FL (Fluorescence Light), dùng thu nhận tín hiệu ánh sáng huỳnh quang từ kênh màu huỳnh quang và số kênh màu huỳnh quang có thể dao động từ 2 đến 18 FL tùy dòng máy; PMT – Photo Multiplier Tube, các ống nhân quang tương ứng với các kênh màu huỳnh quang có vai trò khuếch đại tín hiệu ánh sáng huỳnh quang).

Khi một tế bào hay một vật thể đi qua nguồn sáng, ánh sáng của nguồn sáng sẽ tương tác với vật thể sẽ tạo ra các ánh sáng tán xạ (tán xạ góc thẳng và tán xạ góc bên) và nếu tế bào/vật thể đó được nhuộm màu huỳnh quang, dưới kích thích của nguồn sáng, chất màu huỳnh quang đó sẽ phát ra ánh sáng huỳnh quang. Sau đó các tia sáng này sẽ đi qua hệ thống kính lọc (đó là các thấu kính chỉ cho phép các tia sáng có bước sóng nhất định đi xuyên qua). Với hệ thống kính lọc này các tia sáng tán xạ và ánh sáng huỳnh quang sẽ được phân chia và đi đến hệ thống thu nhận tín hiệu một cách chính xác.

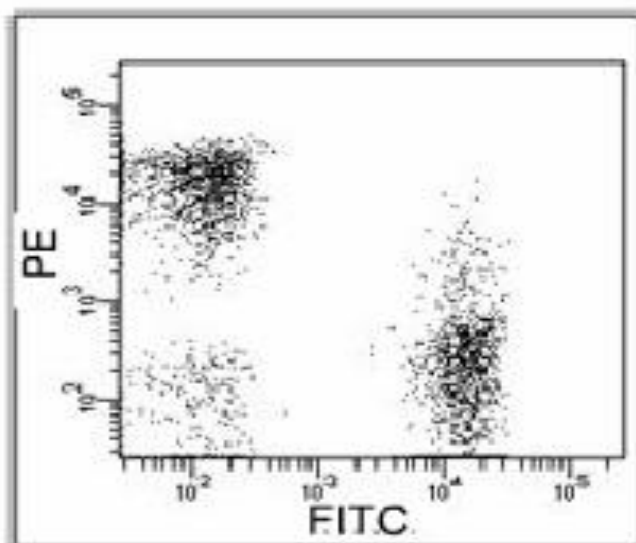


Ánh sáng từ nguồn laser tương tác với tế bào nhuộm kháng thể gắn huỳnh quang sẽ sinh ra các ánh sáng sau: FSC liên quan tới kích cỡ tế bào, SSC liên quan đến độ phức tạp nhân và bào tương tế bào, các ánh sáng huỳnh quang như FITC, PE, PC5 đặc trưng cho các kháng nguyên tương ứng có trên bề mặt tế bào.

Hình 9. Hệ thống quang học

3.3. Hệ thống điện tử (electronics system)

Hệ thống điện tử về bản chất là một hệ thống có trong máy, các tín hiệu của ánh sáng tán xạ và tín hiệu huỳnh quang sau khi được khuếch đại ở PMT sẽ được hệ thống điện tử chuyển thành tín hiệu số đo đếm được và được biểu hiện dưới dạng biểu đồ cột, biểu đồ mật độ hay biểu đồ điểm trên máy tính thông qua các phần mềm chuyển đổi chuyên dụng theo máy.



Chuyển tín hiệu ánh sáng huỳnh quang thành tín hiệu điện tử và biểu diễn dưới dạng đồ thị (ví dụ trong hình vẽ, tín hiệu quang được chuyển thành tín hiệu điện tử và thể được thể hiện trên màn hình máy tính dưới dạng các điểm- đồ thị Dot Plot.

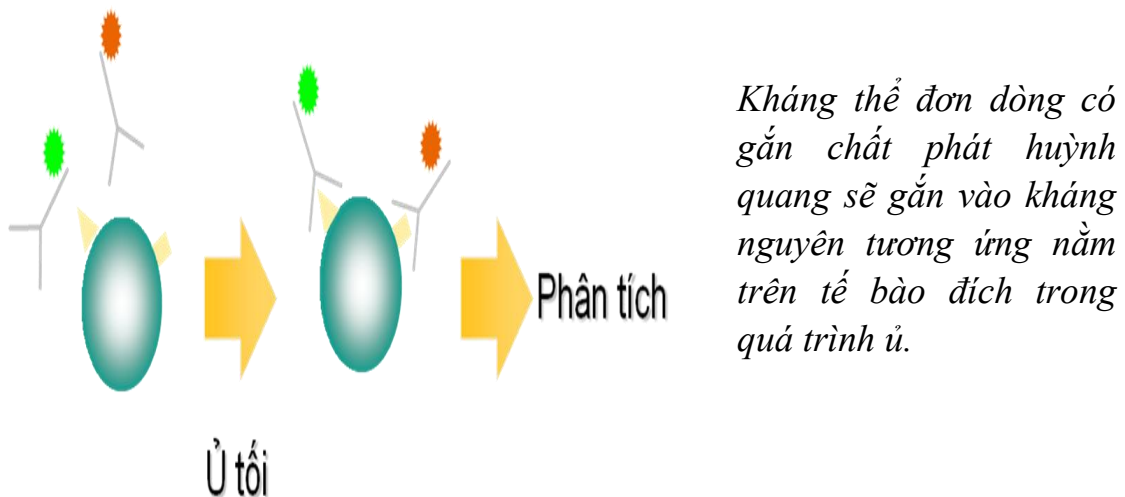
Hình 10. Hiện thị tín hiệu huỳnh quang bằng đồ thị điểm trên máy tính

4. Cơ chế nhuộm kháng nguyên bề mặt tế bào và quá trình thu nhận tín hiệu

4.1. Cơ chế nhuộm kháng nguyên bề mặt

Trên bề mặt các tế bào đích có các kháng nguyên đặc trưng cho từng quần thể tế bào. Ví dụ: trong trường hợp tế bào T-CD4 sẽ có các kháng nguyên đặc trưng là CD3 và CD4. Thông qua việc xác định sự hiện diện các kháng nguyên trên bề mặt tế bào này, người ta có thể xác định sự có mặt cũng như số lượng và phần trăm các tế bào đích tương ứng trong quần thể tế bào phân tích.

Thông thường, người ta sử dụng các kháng thể đơn dòng có gắn chất phát huỳnh quang có khả năng gắn đặc hiệu với các kháng nguyên bề mặt tế bào. Khi được chiếu với mẫu phân tích, các kháng thể đơn dòng có gắn chất phát huỳnh quang sẽ gắn đặc hiệu với kháng nguyên tương ứng chúng có trên bề mặt tế bào.



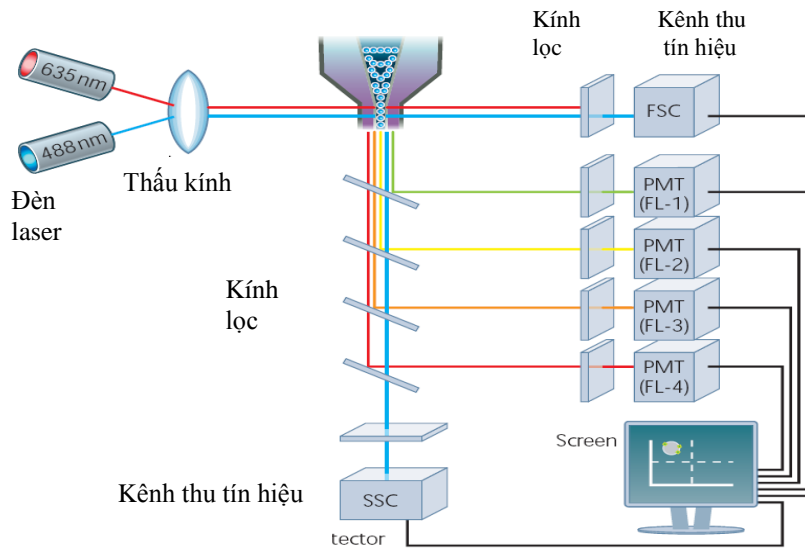
Kháng thể đơn dòng có gắn chất phát huỳnh quang sẽ gắn vào kháng nguyên tương ứng nằm trên tế bào đích trong quá trình ủ.

Hình 11. Nhuộm kháng thể đơn dòng.

Các tế bào có kháng nguyên bề mặt được gắn đặc hiệu với kháng thể có gắn chất phát huỳnh quang khi đi qua chùm tia laser, chất phát huỳnh quang tiếp xúc và hấp thụ năng lượng cao từ nguồn sáng sẽ bị kích thích và giải phóng ra ánh sáng huỳnh quang để trở về trạng thái năng lượng thấp hơn. Các ánh sáng huỳnh quang sẽ qua hệ thống kính lọc được thu nhận bởi hệ thống thu nhận tín hiệu quang học của máy tại những kênh thu tín hiệu huỳnh quang (FL) xác định.

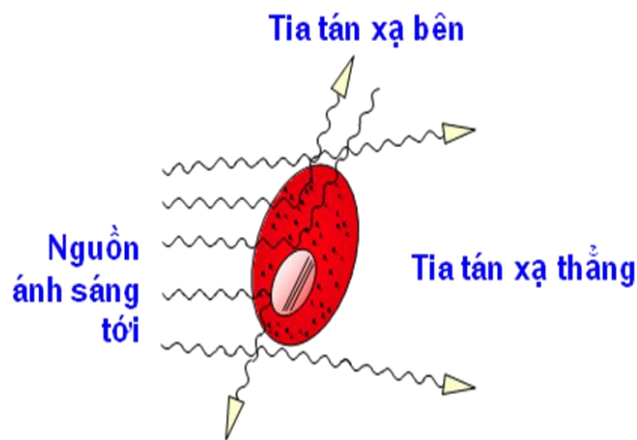
4.2. Quá trình thu nhận tín hiệu

Tế bào/vật thể nhỏ khi di chuyển qua nguồn sáng sẽ tương tác với tia laser và sinh ra các tín hiệu sáng:



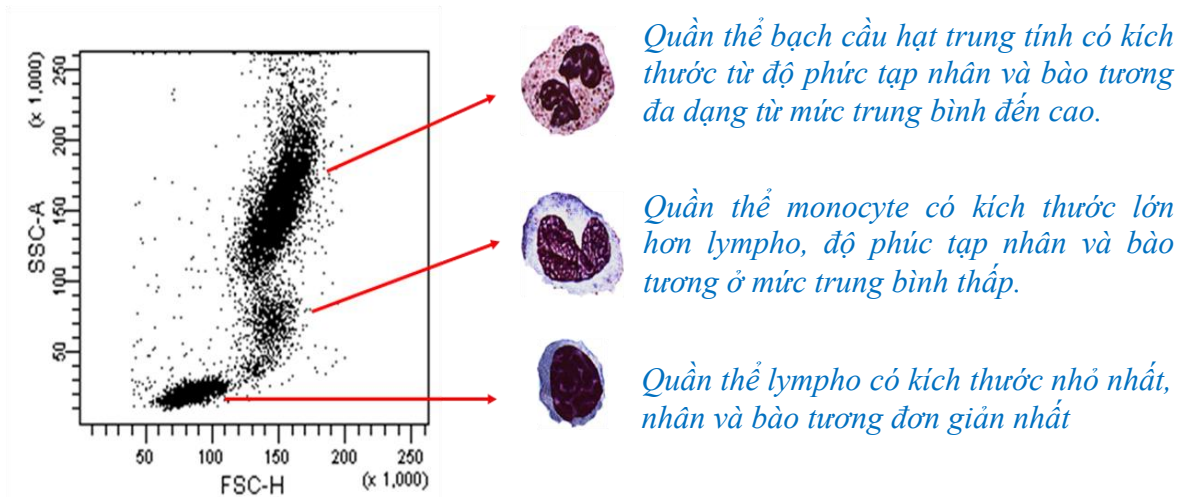
Hình 12. Hệ thống quang học và hệ thống điện tử thu nhận tín hiệu

Ánh sáng tán xạ góc thẳng sẽ được thu nhận qua các kênh FSC (Forward Scatter Chanel). Do được thu nhận thẳng góc (song song) với trục ánh sáng nguồn, ánh sáng tán xạ góc thẳng phản ánh kích thước tế bào/vật thể phân tích (*hình minh họa*). Ánh sáng tán xạ góc bên sẽ được thu nhận qua kênh SSC (Side Scatter Chanel). Do được thu nhận ở góc bên (90 độ) theo trục ánh sáng nguồn, ánh sáng tán xạ góc bên phản ánh độ phức tạp nhân và bào tương của tế bào.



Hình 13. Tán xạ ánh sáng tia laser theo trục thẳng và vuông góc tạo thông số FSC và SSC

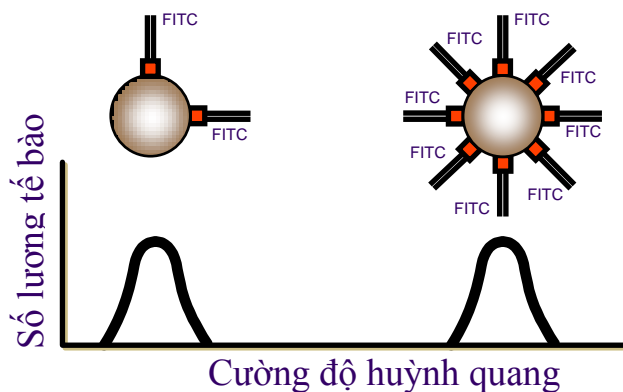
Nếu tế bào có kích thước càng lớn, chỉ số FSC thu được càng lớn. Tế bào càng nhiều hạt hoặc khoang trong bào tương, nhân càng quận, chia múi thì chỉ số SSC càng cao. Như vậy, trong các thành phần bạch cầu có thể thấy chỉ số SSC của quần thể tế bào lympho là thấp nhất, của quần thể mono cao hơn quần thể lympho, và SSC của quần thể bạch cầu hạt đa nhân sẽ lớn nhất.



Hình 14. Đồ thị 2 chiều SSC và FSC của mẫu máu toàn phần đã ly giải hồng cầu cho thấy các quần thể tế bào bạch cầu được phân tách thành 3 quần thể rõ rệt theo kích thước và mức độ phức tạp của cấu trúc bên trong tế bào.

Các tín hiệu màu huỳnh quang (FL-Fluorescent Light) từ phức hợp kháng thể kháng nguyên trên bề mặt tế bào đích cũng được thu nhận theo các kênh màu huỳnh quang và được khuếch đại trong các ống nhân quang PMTs (photomultipliers tube).

Khi tia laser chiếu vào các chất phát huỳnh quang này sẽ tạo ra các ánh sáng huỳnh quang và sau đó các tín hiệu sáng này sẽ được thu nhận, chuyển đổi thành tín hiệu điện tử và biểu thị dưới dạng biểu đồ gồm các quần thể dương tính và âm tính với các huỳnh quang tương ứng với các kháng nguyên cần khảo sát.



Các tế bào không gắn hoặc gắn rất ít với kháng thể đơn dòng sẽ biểu hiện thành cột âm tính (góc trái), quần thể tế bào gắn được nhiều kháng thể đơn dòng sẽ được biểu hiện thành cột dương tính (góc phải).

Hình 15. Hiển thị tín hiệu huỳnh quang trên máy tính phân tích.

Trong một số trường hợp, tín hiệu huỳnh quang có thể được thu nhận một cách không đặc hiệu do các kháng thể gắn huỳnh quang có thể gắn không đặc hiệu với màng tế bào đích, hoặc các tế bào đích có khả năng tự phát huỳnh quang.

Thông thường các hãng khác nhau có đôi chút khác biệt trong việc bố trí đèn huỳnh quang và các hệ thống kính lọc, do vậy các kênh màu huỳnh quang

cũng có đôi chút khác biệt. Điều này cần chú ý vì sẽ liên quan đến việc lựa chọn phối hợp màu huỳnh quang trong các phân tích đa màu.

Tổng hợp các tín hiệu về ánh sáng tán xạ góc thẳng, ánh sáng tán xạ góc bên và các tín hiệu về ánh sáng huỳnh quang tương ứng của một tế bào sẽ giúp chúng ta phân biệt tế bào này với các nhóm tế bào khác trong quần thể. Ngoài ra, việc khoanh vùng (gating) quần thể mong muốn còn giúp thực hiện thống kê hoặc tiếp tục phân tích sâu hơn.

5. Ứng dụng của máy đếm tế bào theo nguyên lý dòng chảy

5.1. Ứng dụng

Có rất nhiều ứng dụng trong chẩn đoán lâm sàng và trong nghiên cứu được triển khai trên máy đếm tế bào dòng chảy:

- Xác định sự biểu hiện của các thụ thể trên bề mặt tế bào: đếm số lượng tế bào lympho T-CD4, xác định các dòng tế bào gây ung thư, đếm tế bào gốc, đếm tế bào hồng cầu lưới, định danh vi khuẩn, nghiên cứu sự biệt hóa tế bào động, thực vật...

- Phân tách tế bào: thu nhận các quần thể tế bào lai cho việc sản xuất kháng thể đơn dòng, các quần thể tế bào miễn dịch cho nuôi cấy tương tác invitro, thu nhận tế bào gốc, thu nhận tinh trùng X hoặc Y.....

- Phân tích chu kỳ ADN/ tế bào: xác định các giai đoạn của chu trình phân bào, khảo sát sự bất thường trong bộ nhiễm sắc thể, xác định tổn thương ADN, nghiên cứu tác dụng của thuốc kháng ung thư lên trên tế bào đích...

- Phát hiện cytokine: định lượng nồng độ cytokine trong dung dịch bằng kỹ thuật dùng hạt bi có gắn kháng thể đơn dòng đặc hiệu với phổ cytokines. Xác định tế bào đích sản xuất các cytokine và bán định lượng thông qua kỹ thuật đo cytokine nội bào...

- Ngoài ra, kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy còn được ứng dụng trong nghiên cứu biến dưỡng tế bào, hoạt động cá kênh ion, các cơ quan nội bào, pH nội bào, ảnh hưởng của thuốc lên trên sinh lý tế bào...

5.2. Đếm tế bào lympho T-CD4 kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy

Ứng dụng của nguyên lý tế bào dòng chảy được dùng trong việc xác định số lượng tuyệt đối và phần trăm số lượng tế bào lympho T-CD4 trong máu toàn phần còn được gọi là xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4.

Để xác định được quần thể tế bào lympho T-CD4 trong máu toàn phần, các hãng khác nhau sử dụng các chiến lược tạo cổng, kháng thể và cách thức tính số

lượng tuyệt đối tế bào khác nhau để xác định số lượng và phần trăm tế bào lympho T-CD4 có trong máu toàn phần.

Số lượng tuyệt đối lympho T-CD4 trong máu toàn phần thường có thể xác định thông qua việc sử dụng các hạt bi với số lượng xác định hoặc đo chính xác thể tích mẫu phân tích chính xác.

Với nguyên lý đo thể tích, thông thường nhà sản xuất thiết kế máy có khả năng đo chính xác một lượng thể tích nhất định, sau đó căn cứ trên số tế bào thực tế đếm được, độ pha loãng và thể tích mẫu máu ban đầu cho vào để tính toán số lượng tuyệt đối lympho T-CD4/ μ l.

$$\text{T-CD4 tuyệt đối}/\mu\text{l} = \frac{\text{Số lượng tế bào đếm được} \times \text{Tổng thể tích mẫu sau}}{\text{Thể tích mẫu được hút bởi máy} \times \text{Thể tích mẫu máu}}$$

Trong khi đó, với nguyên lý xác định thể tích dựa trên bi chuẩn. Ban đầu nhà sản xuất hay người sử dụng cho một lượng bi chuẩn với số lượng biết trước vào trong ống tuýp xử lý mẫu. Sau khi trộn đều với mẫu máu, hỗn dịch tế bào máu và bi chuẩn xem như đồng nhất. Trong quá trình đếm, máy sẽ đếm được một lượng nhỏ xác định bi chuẩn và tế bào máu. Từ các thông số trên, máy sẽ tính toán ra giá trị số lượng tuyệt đối lympho T-CD4

$$\text{T-CD4 tuyệt đối}/\mu\text{l} = \frac{\text{Số lượng tế bào đếm được} \times \text{Tổng số bi chuẩn ban}}{\text{Số bi chuẩn được đếm bởi máy} \times \text{Thể tích mẫu máu}}$$

Các máy đếm tế bào lympho T-CD4 chuyên biệt có thể cho cả giá trị phần trăm và giá trị tuyệt đối của tế bào lympho T-CD4 trong máu toàn phần hay còn gọi là hệ thống 1 máy. Tuy nhiên, trong các trường hợp chỉ có thể ghi nhận giá trị phần trăm lympho T-CD4 hoặc số lượng tuyệt đối tế bào lympho T-CD4 trong máu toàn phần, người ta có thể kết hợp với giá trị tổng lympho bào trong máu thu nhận từ máy huyết học để có thể xác định thông số còn lại. Trong trường hợp sử dụng kết hợp máy đếm tế bào lympho T-CD4 và máy huyết học, người ta gọi đó là phương pháp hai máy.

Cách tính giá trị phần trăm lympho T-CD4 khi có giá trị số lượng tế bào lympho T-CD4 và tổng lympho bào:

$$\text{CD4\%} = \frac{\text{Số lượng tế bào CD4/mm}^3}{\text{Tổng số tế bào lympho/mm}^3} \times 100\%$$

5.3. Quy trình kỹ thuật căn bản cho xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4 bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy

- Khởi động máy: Chuẩn bị dung dịch nạp mẫu (sheath fluid) bao gồm các bước chuẩn bị dung dịch đệm, bật máy và chọn phần mềm tương thích, rửa máy khởi động và đuổi khí trong hệ thống buồng đếm (flow cell).

- Chuẩn máy: Thông thường các hãng khác nhau có thể sử dụng các hóa chất tinh khiết để chuẩn máy. Chuẩn máy có thể được sử dụng để cân chỉnh các kênh thu nhận tín hiệu huỳnh quang hoặc có thể đánh giá độ chính xác của pipette (FacsCount, Guava). Nếu máy đạt các tình trạng tốt thì tiến hành xử lý và phân tích mẫu.

- Xử lý mẫu: Mẫu máu toàn phần với thể tích xác định theo từng quy trình cụ thể sẽ được ủ với kháng thể đặc hiệu để có thể phát hiện quần thể tế bào lympho T-CD4. Tùy loại sinh phẩm được sử dụng mà kết quả thu nhận có thể có các giá trị về phần trăm lympho T-CD4, số lượng tuyệt đối lympho T-CD4 hoặc cả hai. Trong một quy trình chuẩn, mẫu chứng nội được sử dụng để đánh giá toàn bộ quy trình, đảm bảo tính chính xác của xét nghiệm. Mẫu chuẩn hoặc mẫu chứng phải được đưa vào phân tích đầu tiên và được đánh giá kết quả trước khi phân tích mẫu bệnh nhân.

- Ly giải hồng cầu: Hồng cầu trong mẫu nhuộm sẽ được ly giải trước khi đưa vào phân tích bằng các dung dịch ly giải theo bộ sinh phẩm. Sau khi ly giải hồng cầu, mẫu có thể được đưa vào phân tích ngay hoặc ở một số quy trình hai máy thì có thể tiến hành trung hòa và loại bỏ mảnh vỡ tế bào thông qua rửa bằng dung dịch đệm PBS với tỉ lệ 1:1.

- Chạy, phân tích mẫu và ghi nhận kết quả: Các quy trình một máy với bộ sinh phẩm theo máy thường được tiến hành phân tích tự động và không cho can thiệp. Tuy nhiên trong các trường hợp mẫu bất thường về hình thái cũng như mức độ nhuộm màu huỳnh quang, kỹ thuật viên cần nắm rõ các vấn đề về kỹ thuật cũng như các chiến lược tạo cổng và chọn lọc quần thể để tránh sai sót có thể xảy ra. Trong một số hệ thống máy, kỹ thuật viên phải tự phân tích và phân vùng quần thể để thu kết quả.

- Rửa và tắt máy: Sau quá trình chạy mẫu thì việc rửa máy là hết sức quan trọng, nó giúp loại bỏ những mảng bám phát sinh trong quá trình chạy giúp hạn chế tắc nghẽn hệ thống dung dịch lỏng. Dung dịch rửa máy thường đi kèm theo bộ sinh phẩm thường có bản chất là chất tẩy nhẹ như Javel, sau quá trình rửa bằng chất tẩy thì máy bắt buộc phải rửa lại bằng nước cất để tránh bị ăn mòn.

6. Giới thiệu một số loại máy đếm tế bào T-CD4 tại Việt Nam

Hiện có rất nhiều dòng máy hiện diện tại các phòng xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4. Các máy đếm tế bào chuyên dụng có thể kể đến như:

- FacsCalibur - Becton Dickinson (Mỹ).
- Cytomics EC500 - Beckman Coulter (Mỹ).
- Máy Facs Count - Becton Dickinson (Mỹ).
- Máy Cyflow SL3, CyFlow Counter - Partec (Đức).
- PCA – Guava – Milipore (Mỹ).
- Pima analyser – Alere – (Anh).

Bảng tổng hợp so sánh các dòng máy đếm tế bào Lympho T-CD4

Tên máy	Kỹ thuật	Chứng nhận	Công suất máy theo nhà sản xuất	Các chỉ tiêu có thể thu thập
BD-FacsCalibur	Đếm tế bào dòng chảy, sử dụng hạt bi	FDA	200-300 mẫu/ngày	CD4 tuyệt đối, %, phân tích biểu hiện thụ thể, phân tích ADN...
Cytomics FC500	Đếm tế bào dòng chảy sử dụng hạt bi	FDA	300-350 mẫu/ngày	CD4 tuyệt đối, %, phân tích biểu hiện thụ thể, phân tích ADN...
Partec Cyflow Counter	Đếm tế bào dòng chảy, đo thể tích chính xác	CE-IVD	200-250 mẫu/ngày	CD4 tuyệt đối, %
BD- FacsCount	Đếm tế bào dòng chảy, sử dụng hạt bi	FDA	50-60 mẫu/ngày	CD4 tuyệt đối, %
Guava-PCA Auto CD4/CD4%	Đếm tế bào dòng chảy, đo thể tích chính xác	CE-IVD	50-60 mẫu/ngày	CD4 tuyệt đối, %
Pima Analyser	Phân tích hình ảnh, đo thể tích chính xác	CE-IVD	20-25 mẫu/ngày	CD4 tuyệt đối

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

Lựa chọn đáp án đúng cho các câu hỏi sau:

1. Các bộ phận chính của máy đếm tế bào dòng chảy:
 - a. Đèn hồ quang, kính lọc và các chất phát huỳnh quang.
 - b. Hệ thống dòng chất lỏng, hệ thống điện tử và máy tính.
 - c. Hệ thống điện tử, hệ thống quang học và dòng chất lỏng.
 - d. Tất cả các câu trên đều sai.
2. Các chỉ tiêu mà một máy đếm tế bào dòng chảy có thể thu nhận được là
 - a. Kích thước tế bào.
 - b. Tính phức tạp nhân và bào tương tế bào (cấu trúc tế bào).
 - c. Tín hiệu huỳnh quang.
 - d. Tất cả các câu trên đều đúng.
3. Tín hiệu huỳnh quang có thể được thu nhận từ:
 - a. Phức hợp đặc hiệu kháng thể gắn huỳnh quang và kháng nguyên.
 - b. Kháng thể gắn huỳnh quang gắn không đặc hiệu trên màng tế bào đích.
 - c. Một số tế bào có khả năng tự phát huỳnh quang.
 - d. Tất cả các câu trên đều đúng.
4. Hệ thống quang học:
 - a. Bao gồm đèn laser và các thấu kính.
 - b. Có vai trò trong việc tạo tín hiệu huỳnh quang.
 - c. Chuyển và khếch đại tín hiệu huỳnh quang.
 - d. Tất cả các câu trên đều đúng.
5. Hệ thống điện tử:
 - a. Tạo và nhân tín hiệu huỳnh quang.
 - b. Khếch đại tín hiệu huỳnh quang và mã hóa.
 - c. Chuyển tín hiệu điện tử thành dạng biểu đồ.
 - d. Câu a và b đúng.
 - e. Câu b và c đúng.
6. Các dòng máy đếm tế bào lympho T-CD4 sử dụng kỹ thuật đo thể tích chính xác:
 - a. Cyflow và FacsCount.
 - b. Guava và FacsCalibur.
 - c. Cyflow và Guava.
 - d. Facscount và FascCalibur.
7. Ứng dụng phổ biến của máy đếm tế bào dòng chảy:

- a. Xác định kiểu hình miễn dịch, phân tích cấu trúc mô, đo nồng độ cytokine nội bào
 - b. Phân tích thụ quan bề mặt tế bào, khảo sát nồng độ cytokine trong dung dịch
 - c. Xác định kiểu hình miễn dịch, đo cytokine nội bào, phân tách tế bào
 - d. Tất cả các câu trên đều đúng
8. Phương pháp hai máy:
- a. Chính xác hơn phương pháp một máy
 - b. Sai số cao hơn phương pháp một máy
 - c. Độ tin cậy là tương đương phương pháp một máy
 - d. Tất cả các câu trên đều sai
9. Máy FacsCount có thể đọc được các thông số như sau:
- a. SSC và hai màu huỳnh quang
 - b. SSC và một màu huỳnh quang
 - c. FSC và hai màu huỳnh quang
 - d. FSC và một màu huỳnh quang
10. Máy Cyflow Counter có thể đọc được các thông số như sau:
- a. SSC và hai màu huỳnh quang
 - b. SSC và một màu huỳnh quang
 - c. FSC và hai màu huỳnh quang
 - d. FSC và một màu huỳnh quang

Bài 3. QUẢN LÝ MẪU BỆNH PHẨM CHO XÉT NGHIỆM TẾ BÀO T-CD4

Mục tiêu bài học:

Sau khi học xong bài này, học viên có thể trình bày được:

1. Các yếu tố gây ảnh hưởng trước xét nghiệm
2. Cách lấy mẫu, đóng gói, vận chuyển và bảo quản mẫu thích hợp cho xét nghiệm
3. Các nguyên nhân gây sai sót trước khi tiến hành xét nghiệm và đưa ra các giải pháp khắc phục.

Thời gian học tập: 120 phút

Nội dung bài học:

1. Lấy mẫu bệnh phẩm

1.1. Xác định đúng bệnh nhân

Xác định đúng bệnh nhân ngay trước khi lấy mẫu là một yếu tố thiết yếu.

- Xác định đúng bệnh nhân bằng cách “hỏi” và kiểm tra đối chiếu với các thông tin của bệnh nhân được ghi trong phiếu yêu cầu xét nghiệm. Việc này cần được thực hiện trước khi lấy mẫu.

- Các thông tin cần xác định bao gồm: Mã số, họ tên đầy đủ, tuổi, giới tính, địa chỉ, số giường, khoa phòng (nếu bệnh nhân nội trú).

Lưu ý: Nhân viên y tế cần thu thập một số yếu tố có thể ảnh hưởng kết quả xét nghiệm đếm số lượng tế bào T-CD4 như:

+ Giới tính, chủng tộc, tuổi, căng thẳng tâm lý, chu kỳ kinh nguyệt ...

+ Thời điểm trong ngày ảnh hưởng tới số lượng tế bào T-CD4 (thấp nhất lúc 12 giờ 30 phút, cao nhất lúc 20 giờ 30 phút). Do vậy, việc lấy máu xét nghiệm nên được thực hiện vào cùng thời điểm trong ngày để tiện cho việc đánh giá (ví dụ: lấy máu xét nghiệm tế bào T-CD4 lần thứ nhất vào buổi sáng thì lần thứ hai cũng phải lấy máu vào buổi sáng).

+ Mang thai làm loãng máu dẫn đến giảm một lượng ít tế bào T-CD4 nhưng không làm giảm tỉ lệ phần trăm tế bào T-CD4.

+ Một số loại thuốc làm giảm số lượng tế bào T-CD4 (ví dụ như corticosteroid, PEG-IFN, IFN và thuốc hóa trị liệu ung thư).

+ Một số bệnh lý làm tăng số lượng tế bào T-CD4 (ví dụ: cúm, nhiễm HTLV-I...).

1.2. Lấy mẫu

- Sử dụng ống lấy mẫu có chất chống đông EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), thường có nắp màu tím hoặc xanh dương. Chất chống đông EDTA phù hợp với các xét nghiệm công thức máu và phân tích các thành phần tế bào máu, vì EDTA bảo quản hình thái các tế bào máu tốt nhất. Nếu có điều kiện nên sử dụng chất chống đông K2EDTA hoặc K3EDTA và ống lấy máu có áp suất âm.

- Ghi ngày giờ lấy mẫu, mã số hoặc họ tên, tuổi, giới tính của bệnh nhân trên nhãn của ống đựng máu.

- Vị trí lấy máu: Tĩnh mạch cánh tay (phổ biến nhất do lấy được thể tích lớn).

- Dụng cụ lấy máu: Bằng bơm kim tiêm (21-23G) hoặc lấy bằng bộ lấy máu có áp suất âm.

- Thể tích máu 1ml – 2ml. Lấy đủ thể tích máu vào ống chứa chất chống đông theo quy định của nhà sản xuất để đạt được kết quả xét nghiệm chính xác.

- Đảo ngược ống nhẹ nhàng 8-10 lần để đảm bảo máu được trộn đều với chất chống đông, tránh đông vón, đông dây.

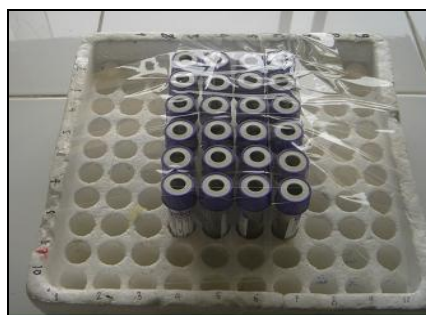
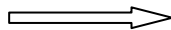
- Để ống máu thẳng đứng trên giá và bảo quản ở nhiệt độ phòng (18-25°C), tránh ánh nắng trực tiếp và chuyển mẫu đến phòng xét nghiệm trong vòng 24 giờ.

2. Đóng gói, bảo quản và vận chuyển mẫu

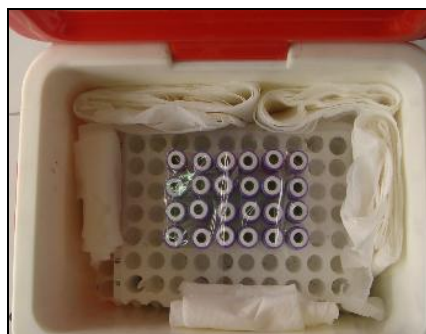
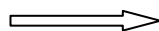
2.1. Đóng gói và bảo quản mẫu

Kiểm tra tất cả các ống máu về thể tích máu, chất lượng mẫu máu và các thông tin trên ống. Thực hiện đóng gói theo các bước sau:

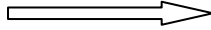
Bước 1: Xếp thẳng đứng các ống máu vào giá đựng mẫu và dùng băng dính cố định các ống mẫu. Đặt nhiệt kế vào giá đựng mẫu.



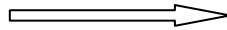
Bước 2: Cho đủ vật thấm hút vào thùng vận chuyển để giảm va chạm hoặc hút thấm khi mẫu bị đổ ra.



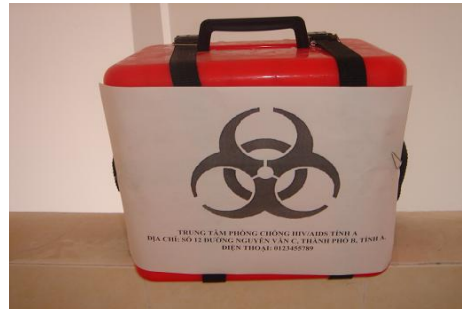
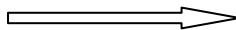
Bước 3: Đặt 1 hoặc 2 túi giữ lạnh vào thùng đựng mẫu nếu nhiệt độ môi trường ngoài > 25°C, tránh tiếp xúc trực tiếp với mẫu. Đảm bảo mẫu được bảo quản và vận chuyển ở nhiệt độ phòng (18 – 25°C).



Bước 4: Đậy nắp thùng đựng mẫu và khoá lại, nếu không có khoá thì dùng băng dính dán xung quanh.



Bước 5: Dán hoặc in ký hiệu “NGUY HIỂM SINH HỌC” và số điện thoại, địa chỉ của cơ sở gửi mẫu bên ngoài thùng đựng mẫu.



2.2. Vận chuyển mẫu máu

- Liên hệ gửi mẫu: Đơn vị gửi mẫu cần thông báo trước cho phòng xét nghiệm T-CD4 về thời gian bệnh phẩm sẽ tới để phòng xét nghiệm bố trí cán bộ tiếp nhận và thực hiện xét nghiệm đảm bảo theo quy định về thời gian lưu mẫu kể từ khi lấy mẫu.

- Thời gian gửi mẫu: Mẫu bệnh phẩm phải được gửi tới phòng xét nghiệm kèm theo phiếu xét nghiệm điền đầy đủ các thông tin trong vòng 24 giờ kể từ thời điểm lấy máu và tốt nhất là trong ngày lấy máu.

- Phương tiện vận chuyển: Tốt nhất là bằng xe ô-tô chuyên dụng. Trong trường hợp điều kiện không cho phép, có thể sử dụng xe gắn máy để vận chuyển nhưng phải buộc hộp chứa mẫu bệnh phẩm thật cẩn thận vào giá đỡ hàng, đảm bảo gọn gàng, tránh đổ, vỡ và tuân thủ đầy đủ các quy định về vận chuyển mẫu bệnh phẩm theo quy định tại Thông tư số 43/2011/TT-BYT ngày 05/12/2011 của

Bộ trưởng Bộ Y tế về quy định chế độ quản lý mẫu bệnh phẩm bệnh truyền nhiễm.

- Người vận chuyển mẫu bệnh phẩm phải là nhân viên của cơ sở chăm sóc, điều trị người bệnh HIV/AIDS hoặc cộng tác viên đã được tập huấn tập huấn. Khi vận chuyển cần mang theo găng tay, thuốc sát trùng và các dụng cụ an toàn để xử lý khi gặp sự cố.

2.3. Tiếp nhận mẫu máu tại phòng xét nghiệm

- Kiểm tra nhãn, phiếu yêu cầu xét nghiệm, phiếu giao nhận mẫu. Đối chiếu thông tin trên nhãn ống bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi chép vào sổ nhận mẫu.

- Đánh giá chất lượng của mẫu:

+ Thực hiện theo hướng dẫn sau:

- Kiểm tra ống đựng mẫu và thành phần trong ống ngay khi mẫu về đến nơi, phải kiểm tra kỹ xem có bị nứt hoặc vỡ không?
- Kiểm tra mẫu có bị tan huyết hoặc bị đông băng không?
- Các mẫu chống đông có bị đông vón hoặc đông dây không?
- Thời gian từ khi lấy mẫu đến khi nhận mẫu có đảm bảo với yêu cầu xét nghiệm không?
- Chất chống đông sử dụng có đúng với yêu cầu xét nghiệm không?
- Lượng mẫu có đủ làm xét nghiệm không?

+ Tiêu chuẩn loại bỏ mẫu: Loại bỏ mẫu và yêu cầu lấy lại mẫu khác trong những trường hợp sau:

- Thiếu thông tin của bệnh nhân (tên, địa chỉ) và ngày, giờ thu thập máu trên ống đựng mẫu máu.
- Mẫu lấy nhầm, không phù hợp thông tin giữa mẫu và phiếu yêu cầu xét nghiệm.
- Thông tin trên ống đựng mẫu máu và trên phiếu xét nghiệm không phù hợp.
- Ống đựng máu với chất chống đông không phải EDTA, ống máu không phù hợp.
- Ống đựng mẫu máu bị nứt hoặc vỡ.
- Mẫu máu bị tán huyết hoặc bị đông băng hoặc có hiện tượng đông vón.

- Điều kiện bảo quản mẫu và vận chuyển không đúng yêu cầu.
- Mẫu máu không đủ thể tích yêu cầu.
- Mẫu máu chuyển đến phòng xét nghiệm quá 24 giờ sau khi lấy máu.
- Mẫu bị pha loãng trong trường hợp lấy máu từ đường đang truyền dịch.
- Nhiệt độ trong thùng gửi mẫu cao hơn 30 °C.

Lưu ý: Trong trường hợp loại bỏ mẫu, phải thông báo cho cơ sở gửi mẫu về chất lượng của việc lấy máu cũng như phải thông báo về việc làm xét nghiệm chậm do phải lấy lại mẫu.

2.4. Lưu giữ mẫu

Sau khi thực hiện xét nghiệm, mẫu máu được lưu giữ trong vòng 12 giờ theo nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất để kiểm tra lại khi cần thiết.

2.5. Hủy bỏ mẫu

Thực hiện theo các quy định tại Thông tư số 43/2011/TT-BYT ngày 05/12/2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế về quy định chế độ quản lý mẫu bệnh phẩm bệnh truyền nhiễm.

2.6. Trao đổi và chuyển mẫu

Trong trường hợp phòng xét nghiệm không thực hiện được xét nghiệm do sự cố (máy hỏng, hết sinh phẩm) thì phòng xét nghiệm cần phải chuyển mẫu bệnh phẩm đến phòng xét nghiệm khác theo hướng dẫn của Cục Phòng, chống HIV/AIDS.

Việc đóng gói, bảo quản, vận chuyển mẫu trong trường hợp này cũng phải thực hiện theo quy định và hướng dẫn tại Mục 2.1 và 2.2.

3. Nguyên nhân và giải pháp khắc phục một số lỗi thường gặp

3.1. Hiện tượng tan huyết

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Gặp khó khăn với quá trình lấy máu tĩnh mạch như trong các trường hợp lấy được ít máu hoặc máu chảy vào dụng cụ lấy máu chậm.	Tập huấn cách lấy máu và tuân thủ quy trình chuẩn lấy máu.
Kéo piston của bơm tiêm quá nhanh	Tuân thủ quy trình chuẩn lấy máu
Lắc hoặc trộn ống máu hoặc trong quá trình vận chuyển mẫu không được giữ	Đảo ngược ống máu nhẹ nhàng 5-6 lần, tuân thủ quy trình chuẩn vận chuyển

Nguyên nhân	Cách khắc phục
gì cần thận.	mẫu máu.
Có kẽ dò không khí do không lắp chặt kim.	Kiểm tra việc lắp chặt kim vào ống bơm tiêm hoặc ống lấy máu
Sử dụng cỡ kim quá nhỏ.	Sử dụng cỡ kim phù hợp tùy theo dụng cụ lấy máu
Đâm kim xuyên qua nắp và bơm mạnh máu vào ống máu	Tháo nắp, bỏ kim, bơm nhẹ máu vào thành ống.
Bụi hoặc nước vẫn còn sót lại trong ống máu khi tái sử dụng ống này để lấy máu	Kiểm tra ống lấy máu trước khi sử dụng

3.2 Hiện tượng cục máu đông hoặc đông một phần

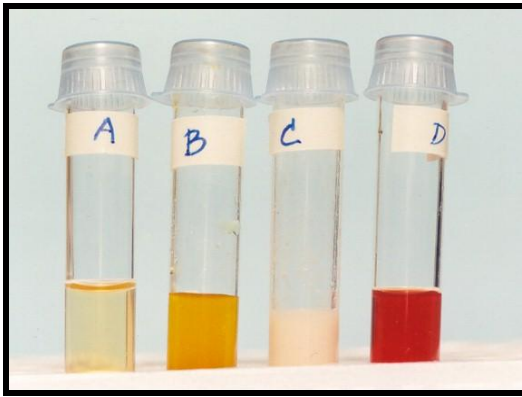
Gây ra hiện tượng số lượng tế bào đếm thấp giả tạo trong xét nghiệm do các thành phần tế bào bị tóm vào lưới fibrin, đông vón tiểu cầu.

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Gặp khó khăn với quá trình lấy máu tĩnh mạch như trong các trường hợp lấy được ít máu hoặc máu chảy vào dụng cụ lấy máu chậm.	Cần tập huấn thuần thục cách lấy máu.
Ống đựng máu không có chất chống đông hoặc hết hạn sử dụng.	Kiểm tra ống máu có chất chống đông EDTA và còn hạn trước khi lấy máu.
Tỷ lệ máu nhiều hơn so với chất chống đông.	Sử dụng ống đựng máu phù hợp với thể tích máu lấy.
Lắc hoặc trộn ống máu không đều.	Đảo ngược ống máu nhẹ nhàng 8-10 lần để máu được trộn đều với chất chống đông.

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

- Hãy kể một số yếu tố ảnh hưởng đến việc đếm số lượng tế bào T-CD4?
- Hãy nêu biện pháp để có thể kiểm soát được các yếu tố trong việc lấy mẫu bệnh phẩm có thể tránh được?
- Anh (chị) cho biết mẫu nào sau đây tương ứng với
 - Mẫu bị tan huyết.
 - Dưỡng chấp.

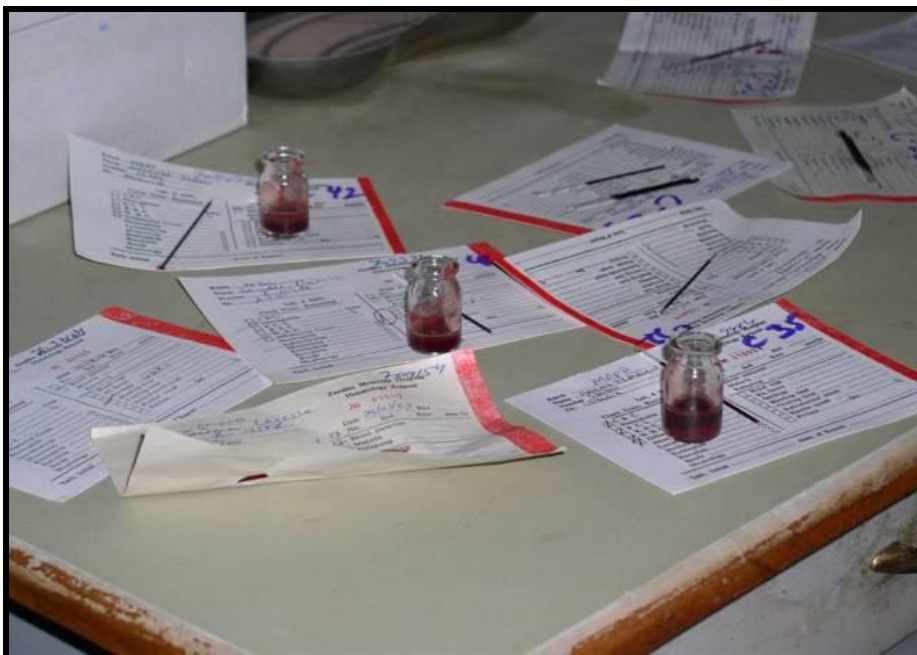
- Mẫu bị vàng.
- Mẫu bình thường.



4. Anh (chị) hãy nêu giải pháp để tránh các lỗi trong lấy máu sau đây :

Lỗi	Giải pháp
Không đúng thông tin xác định bệnh nhân / Sai nhãn	???
Không sử dụng đúng chất chống đông/ống lấy máu	???
Tỷ lệ máu so với chất chống đông không đúng	???
Mẫu bị đông vón một phần	???
Tan huyết	???
Máu bị pha loãng	???

5. Anh (chị) hãy cho biết quá trình xử lý bệnh phẩm này có gì sai?



6. Các tiêu chuẩn loại bỏ mẫu là gì?

7. Anh (chị) cho biết số lượng tế bào T-CD4 cao nhất vào thời điểm nào trong ngày:

a) 8 giờ 30.

b) 12 giờ.

c) 18 giờ.

d) 20 giờ 30.

8. Anh (chị) cho biết quá trình lấy mẫu máu, đóng gói và vận chuyển thuộc giai đoạn nào sau đây:

a) Giai đoạn trước xét nghiệm.

b) Giai đoạn xét nghiệm.

c) Giai đoạn sau xét nghiệm.

Bài 4. TỔNG QUAN VỀ QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG TRONG ĐẾM TẾ BÀO T-CD4

Mục tiêu bài giảng:

Sau khi kết thúc bài giảng, học viên có khả năng trình bày:

1. Các khái niệm về chất lượng, quản lý chất lượng, đảm bảo chất lượng, kiểm soát chất lượng và cải thiện chất lượng;
2. Hai yêu cầu quan trọng trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4: về quản lý và về kỹ thuật.

Thời gian học tập: 120 phút

Nội dung bài học:

1. Các khái niệm

1.1. Chất lượng (Quality): Là tập hợp các đặc tính của một sản phẩm hoặc một dịch vụ nhằm thỏa mãn nhu cầu của người sử dụng sản phẩm/dịch vụ đó.

1.2. Hệ thống quản lý chất lượng (Quality Management System-QMS): Là một loạt các hoạt động phối hợp để chỉ dẫn và điều khiển một phòng xét nghiệm nhằm liên tục cải tiến và nâng cao hiệu quả các hoạt động.

1.3. Đảm bảo chất lượng (Quality Assurance-QA): Là các hoạt động được lập kế hoạch và mang tính hệ thống, quy trình được thực hiện để đảm bảo việc tiến hành thu thập mẫu, thực hiện xét nghiệm, ghi chép và báo cáo kết quả là đạt tiêu chuẩn chất lượng đề ra.

1.4. Kiểm soát chất lượng (Quality Control): Là những phép đo bắt buộc trong quá trình xét nghiệm nhằm kiểm định xem các phép đo có đúng hay không.

1.5. Cải thiện chất lượng (Quality Improvement-QI): Là một quá trình để phân tích, xác định các nguyên nhân chính dẫn đến các vấn đề phát sinh, các sai sót đã được chỉ ra thông qua hoạt động Kiểm soát chất lượng và Đảm bảo chất lượng, sau đó đưa ra các biện pháp khắc phục và xây dựng kế hoạch để cải thiện chất lượng của hệ thống đang thực hiện.

2. Yêu cầu về quản lý chất lượng

Cần tập trung vào các yếu tố thiết yếu sau:

- Hệ thống tổ chức và quản lý.
- Các tiêu chuẩn chất lượng.
- Tài liệu.

- Giám sát và đánh giá.
- Tập huấn.

2.1. Tổ chức và quản lý

- Trưởng phòng xét nghiệm chịu trách nhiệm tổng thể trong khâu thiết kế, triển khai, duy trì và cải thiện hệ thống chất lượng nhưng đảm bảo chất lượng là trách nhiệm của tất cả nhân viên phòng xét nghiệm.

- Phòng xét nghiệm cần xây dựng sổ tay chất lượng trong đó nêu rõ chính sách chất lượng, cam kết của phòng xét nghiệm nhằm đạt được mục tiêu chất lượng đã đề ra. Trưởng phòng xét nghiệm sẽ giao trách nhiệm và quyền hành cho cán bộ thích hợp chịu trách nhiệm trực tiếp về việc thực hiện chính sách và hệ thống chất lượng.

- Để tạo thuận lợi cho việc xây dựng và triển khai hệ thống chất lượng, Ban Lãnh đạo của đơn vị cần phải cam kết thực hiện đảm bảo chất lượng cũng như phân bổ đầy đủ các nguồn lực nhằm triển khai các hoạt động đã lập kế hoạch và phê duyệt để thực hiện.

2.2. Các tiêu chuẩn chất lượng

- Tiêu chuẩn chất lượng là một phần bắt buộc của hệ thống chất lượng nhằm đảm bảo tính an toàn và sự đồng nhất của hệ thống chất lượng. Các hoạt động của phòng xét nghiệm cần phải thực hiện theo các tiêu chuẩn này để đáp ứng các yêu cầu hiện hành của cơ quan quản lý để giám sát chức năng của phòng xét nghiệm.

- Tiêu chuẩn quản lý và tiêu chuẩn kỹ thuật cần phải được giám sát và điều chỉnh kịp thời nhằm đảm bảo chất lượng nhưng cũng cần phải phù hợp với luật pháp sở tại.

2.3. Tài liệu

- Tài liệu là các hướng dẫn bao gồm chính sách chất lượng, sổ tay chất lượng, quy trình, tiêu chuẩn kỹ thuật, các bản báo cáo, bản mô tả công việc của phòng xét nghiệm; và cũng bao gồm các tài liệu gốc bên ngoài (ví dụ: các quy định, các tiêu chuẩn của cơ quan quản lý). Các tài liệu này có thể được lưu trữ dưới các hình thức khác nhau bằng văn bản giấy hoặc văn bản điện tử.

- Hệ thống chất lượng của các phòng xét nghiệm cần xác định và xây dựng các quy trình để kiểm soát tất cả các tài liệu và thông tin (nội bộ và bên ngoài). Các văn bản mới có liên quan cần phải có sẵn ở tất cả các bộ phận triển khai những hoạt động cần thiết cho việc vận hành hiệu quả hệ thống chất lượng.

2.4. Giám sát và đánh giá

- Trưởng phòng xét nghiệm phải xây dựng và triển khai các chỉ số về chất lượng để đánh giá và giám sát một cách hệ thống việc thực hiện xét nghiệm. Việc giám sát và đánh giá giúp phát hiện được các sai sót và xác định được các cơ hội cải thiện chất lượng trong phòng xét nghiệm, trưởng phòng xét nghiệm sẽ thực hiện các hành động thích hợp để khắc phục các sai sót. Công tác quản lý các sai sót cũng cần được thực hiện một cách chặt chẽ và sát sao.

- Ngoài ra, còn có một số công cụ đánh giá chất lượng khác đó là thông qua việc đánh giá nội bộ và tham gia vào chương trình đánh giá chất lượng từ bên ngoài và kết quả đánh giá này sẽ đưa ra định hướng giúp nhóm cán bộ quản lý cải thiện thêm về chất lượng

2.5. Tập huấn

- Phòng xét nghiệm phải xây dựng chương trình tập huấn phù hợp cho tất cả các nhân viên để đảm bảo thực hiện tốt các công việc được giao.

- Chương trình đào tạo cần làm cho học viên hiểu được tại sao chất lượng lại quan trọng và chương trình đào tạo cần đi đôi với thực hành tại phòng xét nghiệm. Tập huấn cho nhân viên cần phải dựa trên năng lực và phải triển khai các hoạt động hỗ trợ sau tập huấn.

3. Yêu cầu về kỹ thuật:

Bao gồm các thành tố sau:

- Nhân sự.
- Cơ sở hạ tầng và điều kiện môi trường.
- Thiết bị phòng xét nghiệm.
- Các giai đoạn trước, trong và sau xét nghiệm.
- Báo cáo kết quả.
- Kiểm soát chất lượng .

3.1. Nhân sự

- Nhân sự là nguồn lực quan trọng nhất của phòng xét nghiệm. Nhân viên phòng xét nghiệm cần có vốn kiến thức phù hợp và có đủ kinh nghiệm để thực hiện các nhiệm vụ được giao. Phòng xét nghiệm cần có đủ nhân viên để đáp ứng công việc được giao cũng như thực hiện các chức năng khác của hệ thống quản lý chất lượng.

- Trưởng phòng xét nghiệm phải xây dựng kế hoạch tổ chức bao gồm chính sách về nhân sự, sơ đồ báo cáo, bản mô tả công việc (trong đó có quy định rõ về

trình độ và nhiệm vụ của tất cả các nhân viên). Phòng xét nghiệm cần lưu giữ hồ sơ của tất cả nhân viên bao gồm bản mô tả công việc, bằng cấp, sơ yếu lý lịch và trình độ đào tạo.

3.2. Cơ sở hạ tầng và điều kiện môi trường

Phòng xét nghiệm phải có đủ diện tích cho khối lượng công việc và được thiết kế phù hợp để đảm bảo an toàn và sự thoải mái cho nhân viên.

3.3. Trang thiết bị

- Phòng xét nghiệm phải được trang bị đầy đủ các thiết bị cần thiết cho việc cung cấp các dịch vụ (từ lấy mẫu, xử lý mẫu, xét nghiệm mẫu và lưu trữ mẫu). Tất cả các thiết bị cần đảm bảo hoạt động tốt và yêu cầu phải có tài liệu hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất và sổ tay vận hành.

- Phòng xét nghiệm phải có kế hoạch thẩm định, hiệu chuẩn và bảo dưỡng định kỳ các trang thiết bị. Các trang thiết bị cần được quản lý chặt chẽ, ghi tên nhãn mác, phải có tài liệu hướng dẫn sử dụng cũng như hồ sơ liên quan (như sổ theo dõi vận hành thiết bị, sổ theo dõi bảo dưỡng thiết bị ...), phải được bảo dưỡng đầy đủ và thống nhất theo quy định của hướng dẫn chất lượng.

- Cán bộ sử dụng cần phải được tập huấn về sử dụng thiết bị, nếu thiết bị cần được sửa chữa thì sau khi nhận lại thì phải kiểm tra, hiệu chuẩn lại trước khi sử dụng.

3.4. Các giai đoạn xét nghiệm

- *Giai đoạn trước xét nghiệm:* Mẫu máu cần phải được lấy, dán nhãn, bảo quản, đóng gói và vận chuyển đúng cách. Các tiêu chí chấp nhận và loại bỏ mẫu phải được xây dựng và tuân thủ một cách nghiêm ngặt nhằm bảo đảm tính nguyên vẹn của mẫu máu (tham khảo bài Quản lý mẫu bệnh phẩm).

- *Giai đoạn trong xét nghiệm:* Phòng xét nghiệm phải tuân thủ đúng hướng dẫn của nhà sản xuất và các hướng dẫn quốc gia trong khi tiến hành xét nghiệm. Ngoài ra, phòng xét nghiệm cũng nên xây dựng các quy trình chuẩn (SOP) riêng dựa vào hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc hướng dẫn quốc gia. Các quy trình chuẩn cần được lưu trữ ở vị trí giúp nhân viên có thể dễ dàng tiếp cận và phải tuân thủ chặt chẽ các quy trình này.

- *Giai đoạn sau xét nghiệm:* Trưởng phòng xét nghiệm phải kiểm tra các kết quả xét nghiệm trước khi trả kết quả. Mẫu bệnh phẩm phải được lưu giữ theo chính sách/quy định của phòng xét nghiệm và sau đó được thải bỏ theo đúng quy định về an toàn sinh học.

3.5 Báo cáo kết quả

- Trưởng phòng xét nghiệm phải rà soát và kiểm tra các kết quả xét nghiệm một cách hệ thống và trước khi trả kết quả cho bệnh nhân.

- Báo cáo cần phải rõ ràng, không mơ hồ và ghi rõ ngày tháng, thời gian, quy trình được sử dụng, danh tính và địa chỉ của bệnh nhân cũng như họ tên của cán bộ cho phép công bố báo cáo có kèm chữ ký.

- Phòng xét nghiệm cũng nên giữ lại tất cả hồ sơ, bảng biểu và mẫu báo cáo trong hai năm hoặc theo các chính sách đã được thông qua.

- Tùy theo loại máy được sử dụng mà cán bộ xét nghiệm phải ghi lại tất cả các thông số cần được báo cáo trong biểu mẫu trả lời kết quả (ví dụ: tỉ lệ phần trăm và số tuyệt đối số tế bào lympho T-CD4, hoặc % tế bào lympho T-CD4).

3.6 Kiểm soát chất lượng (tham khảo bài Kiểm soát chất lượng)

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

Chọn câu trả lời đúng cho các câu hỏi sau:

1. Hệ thống quản lý chất lượng (QMS) là:

a. Những phép đo bắt buộc trong quá trình xét nghiệm nhằm kiểm định xem các phép đo có đúng hay không?

b. Chương trình tổng thể nhằm đảm bảo rằng kết quả xét nghiệm cuối cùng là đúng.

c. Tất cả các phương tiện phục vụ cho quá trình quản lý chất lượng (tổ chức, nhân sự, quy trình, quá trình,...)

d. Cả 3 câu đều đúng.

2. Quá trình đảm bảo chất lượng xét đến tất cả các yếu tố gây ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm tính từ khi:

a. Người bệnh được yêu cầu làm xét nghiệm cho tới khi báo cáo kết quả xét nghiệm.

b. Phòng xét nghiệm thu nhận mẫu bệnh phẩm cho tới khi báo cáo kết quả xét nghiệm.

c. Phòng xét nghiệm phân tích kết quả cho tới khi trả kết quả xét nghiệm.

d. Câu (a) và (c)

3. Tài liệu là:

a. Các hồ sơ được lưu giữ tại phòng xét nghiệm ví dụ: phiếu trả lời kết quả, báo cáo tình hình xét nghiệm hàng tháng.

b. Các văn bản hay hướng dẫn ví dụ: quy trình thực hiện xét nghiệm đếm tế bào T-CD4.

c. Các biểu mẫu cho sẵn được dùng để điền các thông tin về bệnh nhân hay kết quả xét nghiệm ví dụ: Phiếu yêu cầu xét nghiệm

d. Cả câu (a) và (c)

4. Trong hệ thống đảm bảo chất lượng xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 các yêu cầu về quản bao gồm:

a. Nhân sự; Tổ chức; Tập huấn; Đánh giá và Kiểm soát chất lượng.

b. Nhân sự; Tổ chức và quản lý; Các tiêu chuẩn chất lượng; Tài liệu và Kiểm soát chất lượng c. Cả câu (a) và (b).

c. Hệ thống tổ chức và quản lý; Các tiêu chuẩn chất lượng; Tài liệu; Giám sát và đánh giá và Tập huấn.

d. Hệ thống tổ chức và quản lý; Các tiêu chuẩn chất lượng; Tài liệu; Giám sát và đánh giá và Kiểm soát chất lượng.

5. Trong hệ thống đảm bảo chất lượng xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 các yêu cầu về kỹ thuật bao gồm:

a. Nhân sự; Tổ chức; Đánh giá giám sát; Ghi chép và lưu giữ hồ sơ; Báo cáo kết quả; Trang thiết bị.

b. Nhân sự; Cơ sở hạ tầng và điều kiện môi trường; Thiết bị phòng xét nghiệm; Các giai đoạn trước, trong và sau xét nghiệm; Báo cáo kết quả; Kiểm soát chất lượng.

c. Nhân sự; Tổ chức; Báo cáo kết quả; Kiểm soát chất lượng; Trang thiết bị; Báo cáo kết quả;

d. Nhân sự; Các tiêu chuẩn chất lượng; Thiết bị phòng xét nghiệm; Báo cáo kết quả; Đánh giá giám sát;

Câu 6: Giai đoạn trong xét nghiệm yêu cầu:

a. Cán bộ xét nghiệm phải xây dựng SOP về tiêu chí chấp nhận và loại bỏ mẫu bệnh phẩm.

b. Cán bộ xét nghiệm phải xây dựng SOP để kiểm tra báo cáo kết quả xét nghiệm cho bệnh nhân.

c. Cán bộ xét nghiệm phải xây dựng tất cả các SOP liên quan đến toàn bộ quy trình từ khâu lấy mẫu đến trả kết quả.

d. Cán bộ xét nghiệm phải xây dựng SOP về việc thực hiện xét nghiệm dựa theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Câu 7: Sau khi thực hiện xong xét nghiệm, các kết quả xét nghiệm được:

- a. Cán bộ xét nghiệm trả ngay cho bệnh nhân
- b. Trưởng phòng xét nghiệm phải rà soát và kiểm tra trước khi trả cho bệnh nhân.
- c. Được cán bộ xét nghiệm lưu vào sổ và trả cho bệnh nhân
- d. Cả câu (b) và (c)

Câu 8: Báo cáo kết quả xét nghiệm thuộc:

- a. Giai đoạn trước xét nghiệm
- b. Giai đoạn trong xét nghiệm
- c. Giai đoạn sau xét nghiệm
- d. Câu (b) và (c)

Bài 5. KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG TRONG XÉT NGHIỆM ĐẾM TẾ BÀO T-CD4

Mục tiêu bài giảng:

Sau khi kết thúc bài giảng, học viên có khả năng trình bày:

1. Các khái niệm về kiểm soát chất lượng, nội kiểm tra, ngoại kiểm tra, chất chuẩn máy, chất kiểm chứng.
2. Cách sử dụng biểu đồ Levey-Jennings và phân tích kết quả nội kiểm.

Thời gian bài học: 120 phút

Nội dung bài học:

1. Các khái niệm

1.1. Kiểm soát chất lượng:

Là những phép đo bắt buộc trong quá trình xét nghiệm nhằm kiểm định xem các phép đo có đúng hay không. Kiểm soát chất lượng bao gồm nội kiểm tra và ngoại kiểm tra.

1.2. Kiểm soát chất lượng nội bộ hay nội kiểm tra (Internal Quality Control-IQC):

Là quy trình theo dõi độ tập trung và độ chính xác của kết quả chạy mẫu chuẩn và mẫu chứng trước mỗi đợt làm xét nghiệm trên mẫu bệnh phẩm để phát hiện ra các sai sót chính trong quá trình thực hiện.

Thực hiện kiểm tra bao gồm:

- *Mẫu chuẩn máy* (calibrators): Là chất có thành phần không giống mẫu bệnh nhân, có độ tinh khiết cao và giá trị đã được biết trước. Mẫu chuẩn được sử dụng để hiệu chuẩn máy tại giá trị máy được cài đặt và đánh giá độ chính xác.

- *Mẫu kiểm chứng* (controls): Là chất có thành phần tương tự như mẫu bệnh nhân với giá trị được biết trước. Mẫu chứng được sử dụng để đảm bảo quy trình xét nghiệm đang thực hiện đúng và đánh giá độ tập trung.

1.3. Đánh giá chất lượng bên ngoài hay ngoại kiểm tra (External Quality Assessment-EQA): Là một hệ thống để đánh giá khách quan về năng lực của phòng xét nghiệm thông qua một đơn vị hay tổ chức bên ngoài.

2. Những yếu tố ảnh hưởng tới xét nghiệm đếm tế bào T-CD4

- Kiến thức cơ bản cùng kỹ năng của nhân viên phòng xét nghiệm.
- Tình trạng mẫu bệnh phẩm.
- Mẫu kiểm chứng sử dụng trong quá trình xét nghiệm.
- Hóa chất, sinh phẩm.

- Trang thiết bị.
- Đọc kết quả xét nghiệm.
- Sao chép kết quả xét nghiệm.
- Báo cáo kết quả xét nghiệm.

3. Quy trình kiểm soát chất lượng nội bộ

3.1. Vẽ biểu đồ Levey-Jennings

- Biểu đồ Levey Jennings gồm 7 đường thẳng: Giá trị trung bình; Giá trị trung bình ± 1 độ lệch chuẩn ($\pm 1SD$); Giá trị trung bình ± 2 độ lệch chuẩn ($\pm 2SD$); Giá trị trung bình ± 3 độ lệch chuẩn ($\pm 3SD$) trong đó trục tung thể hiện giá trị của chúng, trục hoành là thời điểm (lần) thực hiện mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng).

- Tính toán giá trị trung bình và độ lệch chuẩn:

Phòng xét nghiệm cần phải tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn riêng của phòng xét nghiệm từ mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) đã biết trước giá trị do nhà sản xuất hoặc đơn vị đảm bảo chất lượng cung cấp.

Bước 1: Chạy mẫu kiểm chứng trên để thu 20-30 điểm số liệu trong 20 ngày hoặc ít nhất trong 10 ngày.

Bước 2: Loại bỏ những kết quả không nằm trong giới hạn cho phép của nhà sản xuất hoặc đơn vị đảm bảo chất lượng.

Bước 3: Tính giá trị trung bình theo công thức dưới đây:

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 \dots X_n}{n}$$

Trong đó: X là giá trị trung bình cộng (X = mean)

$X_{1,2,3 \dots n}$: giá trị thu được của lần chạy thứ 1,2,3... đến lần thứ n

n: số lần chạy

Bước 4: Tính giá trị độ lệch chuẩn

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Trong đó: SD = Standard Deviation: Độ lệch chuẩn

X_1 : giá trị thu được của lần chạy thứ 1

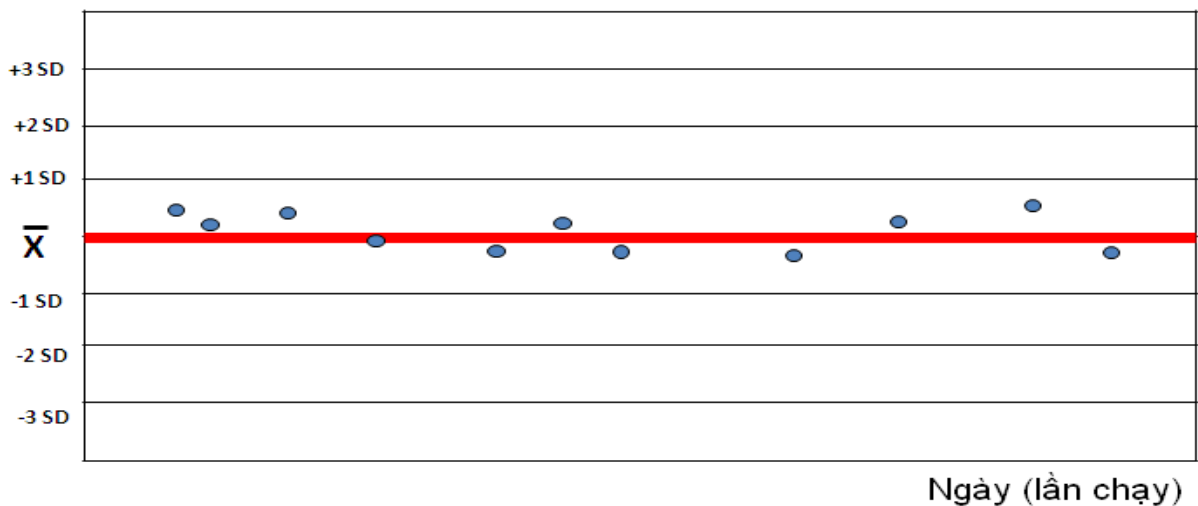
X: giá trị trung bình cộng

n: số lần chạy

Bước 5: Từ giá trị trung bình và độ lệch chuẩn ở trên tính tiếp $X \pm 1SD$; $X \pm 2SD$ và $X \pm 3SD$ và vẽ biểu đồ Levey -Jennings như hình 22

Lưu ý: Trong thời gian phòng xét nghiệm chưa thu được 20 điểm số liệu thì phòng xét nghiệm sử dụng giá trị trung bình ($X = \text{Mean}$) trên chai/túi của mẫu chuẩn máy và mẫu kiểm chứng do nhà sản xuất hoặc đơn vị đảm bảo chất lượng cung cấp để tính độ lệch chuẩn (SD) tương ứng với các mẫu chuẩn máy (một hay nhiều mẫu chuẩn máy). Trong trường hợp giá trị của mẫu chuẩn máy và mẫu kiểm chứng cho dưới dạng giá trị trung bình $\pm 10\%$ ($X \pm 10\%$) thì lấy $1SD = 5\%$ của giá trị trung bình, $2SD = 10\%$ của giá trị trung bình. Từ đó, vẽ biểu đồ Levey-Jennings (hình 22).

- Nếu phòng xét nghiệm CD4 sử dụng nhiều hơn 1 mẫu chuẩn máy và mẫu kiểm chứng thì mỗi mẫu phải được vẽ riêng trên mỗi biểu đồ Levey-Jennings.



Hình 22. Biểu đồ Levey – Jenning theo dõi kết quả chạy mẫu chuẩn hoặc mẫu chứng

3.2. Phân tích mẫu chuẩn máy và mẫu kiểm chứng

Trước mỗi đợt thực hiện xét nghiệm cho bệnh nhân cần chạy mẫu chuẩn máy và mẫu chứng đã biết trước về giá trị do nhà sản xuất hoặc đơn vị đảm bảo chất lượng cung cấp.

3.2.1. Chạy mẫu chuẩn máy theo quy trình của nhà sản xuất

- Điền kết quả chạy mẫu chuẩn lên biểu đồ Levey-Jennings, đối chiếu và phân tích kết quả chạy chuẩn máy với giá trị đã được cho trước (tham khảo mục 3.3).

- Nếu kết quả chạy mẫu chuẩn máy đạt, chạy mẫu kiểm chứng.

- Nếu kết quả chạy mẫu chuẩn máy không đạt, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn máy.

3.2.2 Chạy mẫu kiểm chứng giống như quy trình thực hiện xét nghiệm trên mẫu bệnh phẩm.

- Điền kết quả chạy mẫu chuẩn lên biểu đồ Levey –Jennings, đối chiếu và phân tích kết quả với giá trị đã được cho trước (tham khảo mục 3.3).

- Nếu kết quả chạy mẫu chứng đạt, thực hiện xét nghiệm trên mẫu bệnh nhân.

- Nếu kết quả chạy mẫu chứng máy không đạt, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chứng.

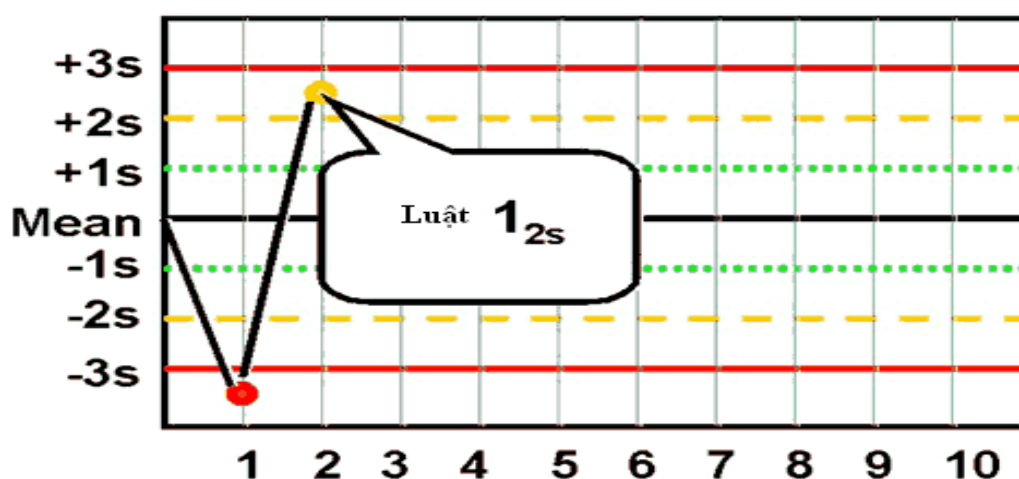
3.3. Phân tích kết quả

Việc phân tích kết quả nội kiểm phụ thuộc vào số lần chạy mẫu chứng với mẫu bệnh nhân. Áp dụng các quy luật Westgard để phân tích kết quả chạy mẫu chuẩn và mẫu chứng.

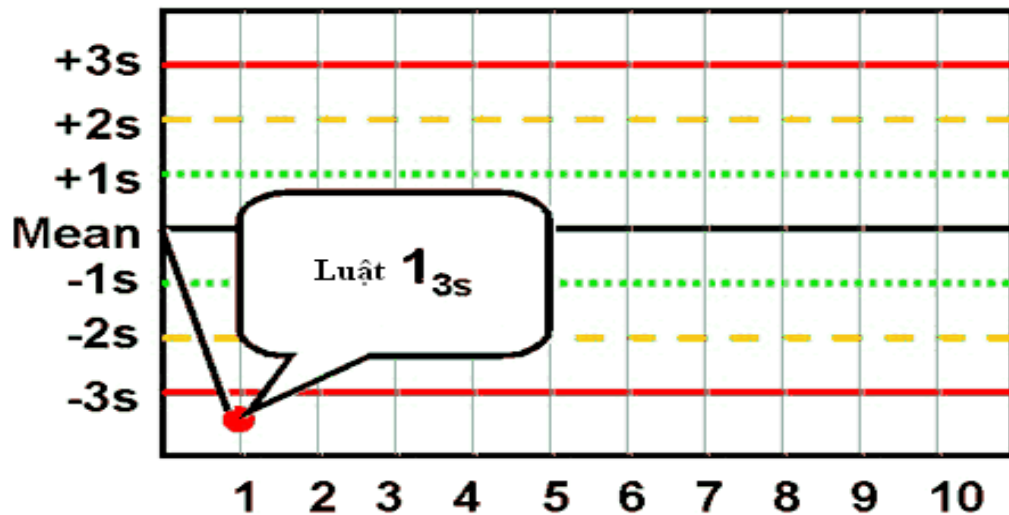
3.3.1. Định nghĩa luật Westgard: Luật Westgard là các luật kiểm soát chất lượng (Quality control - QC) được xây dựng dựa trên các phương pháp thống kê, nhằm phân tích xem các kết quả chạy mẫu chuẩn hoặc mẫu chứng nằm trong hay ngoài giới hạn cho phép.

3.3.2. Các quy luật Westgard

Luật 1_{2s}: Khi một kết quả chạy mẫu chuẩn hoặc mẫu chứng nằm ngoài giới hạn ± 2 SD nhưng vẫn nằm trong giới hạn ± 3 SD và không có các lỗi khác xảy ra thì nguyên nhân có thể là do lỗi ngẫu nhiên, trường hợp này cảnh báo cho phòng xét nghiệm cần giám sát các lần xét nghiệm tiếp theo và không cần làm lại xét nghiệm.



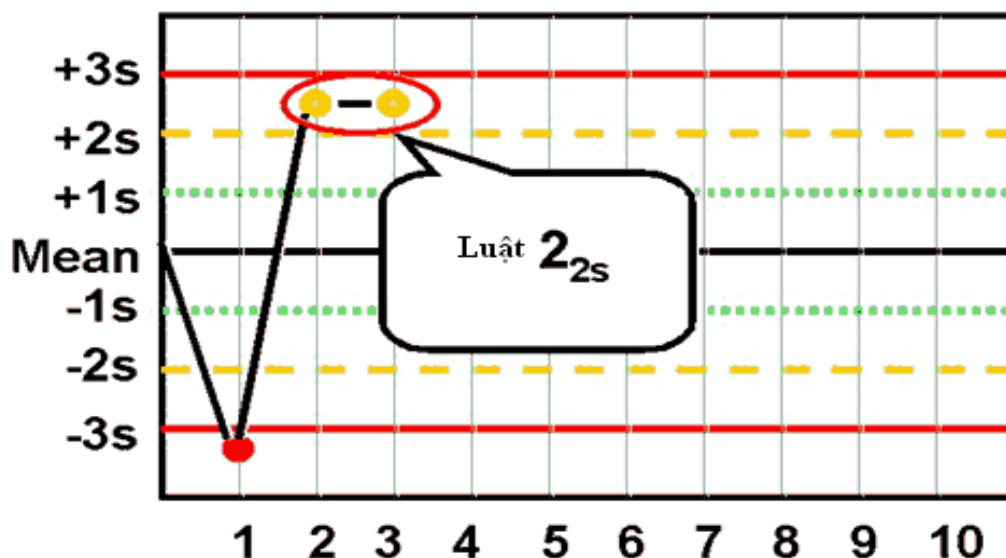
Luật 1_{3s}: Khi một kết quả chạy mẫu chuẩn hoặc mẫu chứng nằm ngoài giới hạn ± 3 SD, nguyên nhân có thể là do lỗi ngẫu nhiên, trường hợp này phòng xét nghiệm phải loại bỏ kết quả của lần chạy và làm lại xét nghiệm trước khi thực hiện xét nghiệm trên mẫu bệnh nhân.



Luật 2_{2s}: Áp dụng qua các lần chạy liên tiếp nhau của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng); hoặc trong cùng một lần chạy của các mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) khác nhau:

- Khi hai kết quả liên tiếp của một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) nằm cùng một phía ngoài giới hạn + 2SD hoặc - 2SD thì lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.

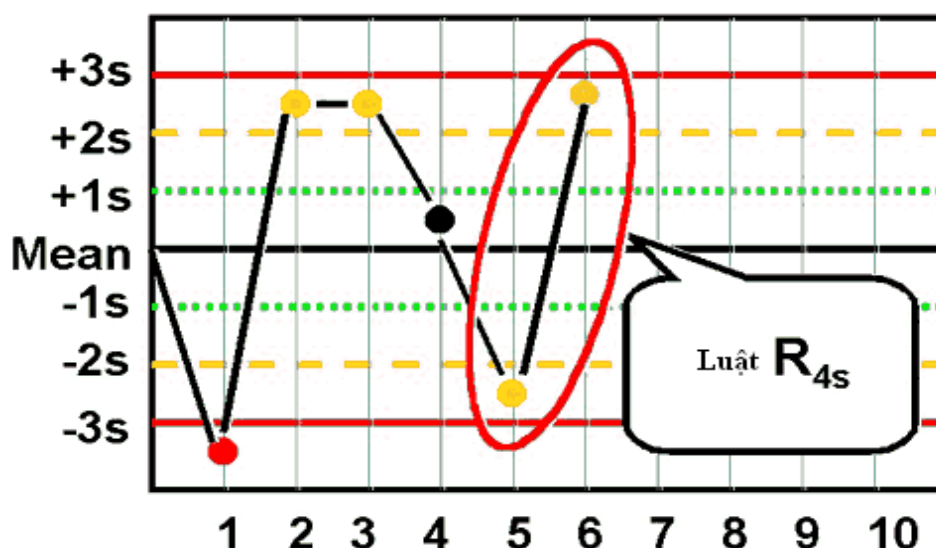
- Khi kết quả của hai mức mẫu chứng khác nhau trong cùng lần chạy nằm ngoài giới hạn + 2SD hoặc - 2SD (ví dụ: kết quả của mức mẫu chuẩn thấp (hoặc mẫu kiểm chứng thấp) nằm ngoài giới hạn + 2SD và kết quả của mức mẫu chuẩn trung bình (hoặc mẫu kiểm chứng trung bình) cũng nằm ngoài giới hạn + 2SD) thì lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.



Luật R_{4s}: Áp dụng qua các lần chạy liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng); hoặc trong cùng một lần chạy của các mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) khác nhau.

- Khi hai kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) có sự chênh lệch vượt quá $\pm 4SD$ (ví dụ: khi một kết quả nằm ngoài giới hạn $+2SD$ và kết quả xét nghiệm tiếp theo nằm ngoài giới hạn $-2SD$ hoặc ngược lại) kết quả chạy mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) không đạt, đây là lỗi ngẫu nhiên, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.

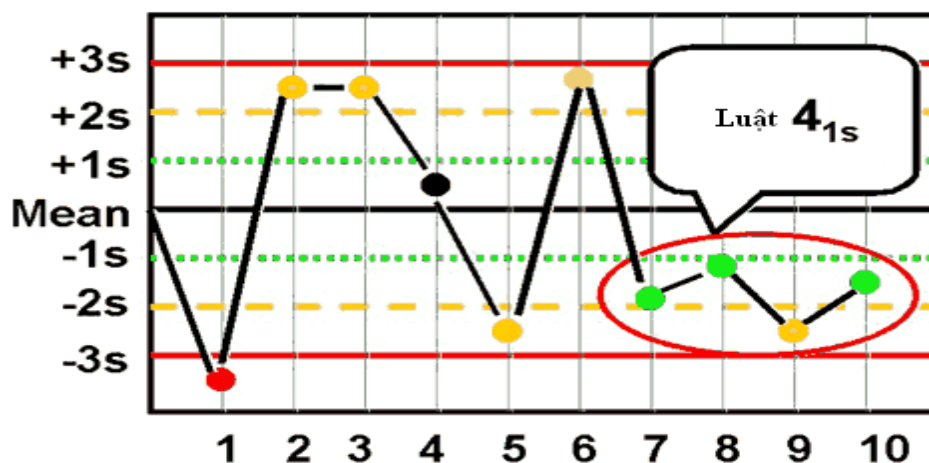
Khi kết quả trong cùng một lần chạy ở hai mức mẫu chứng khác nhau có sự chênh lệch vượt quá $\pm 4SD$ (ví dụ: khi một kết quả của mức mẫu chứng thấp nằm ngoài giới hạn $+2SD$ và kết quả của mức mẫu chứng trung bình nằm ngoài giới hạn $-2SD$ và ngược lại) thì lần chạy này không đạt, đây là lỗi ngẫu nhiên, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng..



Luật 4_{1s}: Áp dụng ở các lần chạy liên tiếp nhau của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng); hoặc của các mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) khác nhau.

- Khi 4 kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) cùng nằm trên giới hạn $+1SD$ hoặc dưới giới hạn $-1SD$ thì kết quả lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.

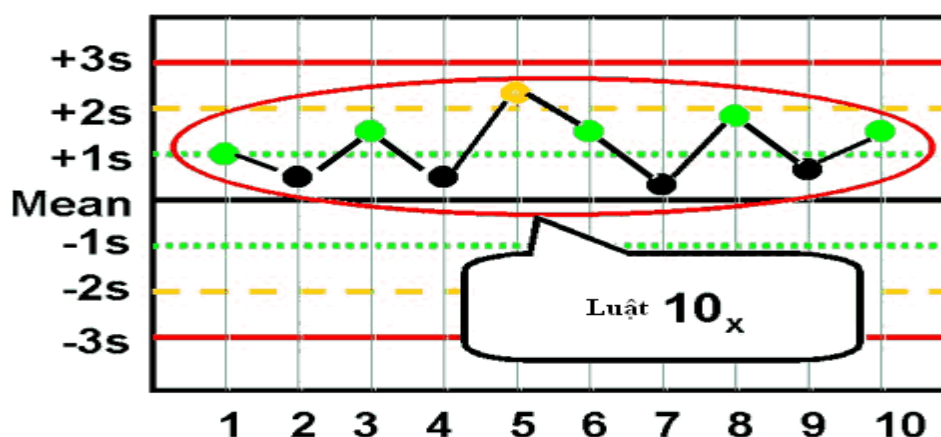
Khi 2 kết quả liên tiếp của hai mức mẫu chuẩn (hoặc hai mẫu kiểm chứng) cùng nằm phía trên $+1SD$ hoặc dưới giới hạn $-1SD$ (ví dụ: hai kết quả liên tiếp của mức mẫu chuẩn thấp nằm phía trên $+1SD$ và hai kết quả liên tiếp của mức mẫu chuẩn trung bình cũng nằm cùng nằm trên giới hạn $+1SD$ hoặc dưới giới hạn $-1SD$), kết quả lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng



Luật 10_x: Áp dụng ở các lần chạy liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) hoặc của hai mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) khác nhau.

- Khi 10 kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) cùng nằm về 1 phía trên hoặc dưới giá trị trung thì kết quả lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.

- Khi 5 kết quả liên tiếp của mỗi mức mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng cùng nằm phía trên hoặc dưới giá trị trung bình (ví dụ: 5 kết quả liên tiếp của mức mẫu chứng thấp đều nằm phía trên giá trị trung bình và 5 kết quả liên tiếp của mức mẫu chứng cao cũng nằm phía trên giá trị trung bình) thì kết quả lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng

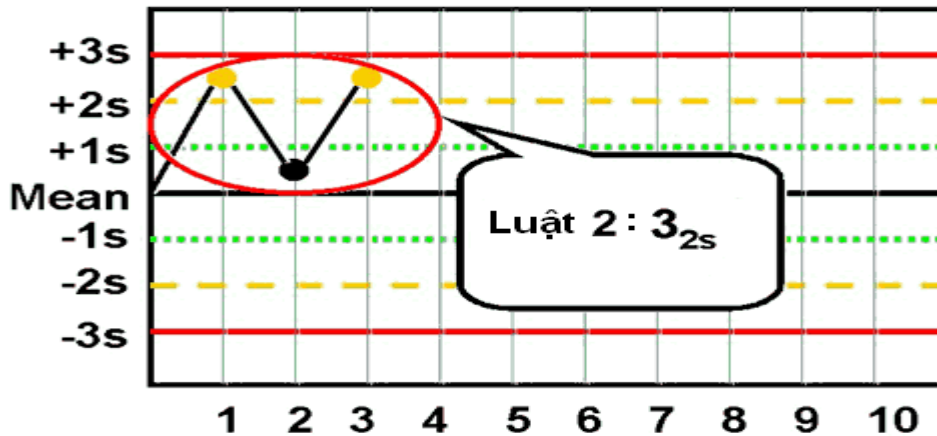


Luật 2:3_{2s}: Áp dụng qua các lần chạy liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng); hoặc qua các lần chạy của các mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) khác nhau.

- Khi 3 kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) cùng nằm về một phía và trong đó có 2 kết quả *liên tiếp hoặc không liên*

tiếp nằm ngoài giới hạn +2SD hoặc -2SD, thì lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống tìm hiểu nguyên nhân, thực hiện biện pháp khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.

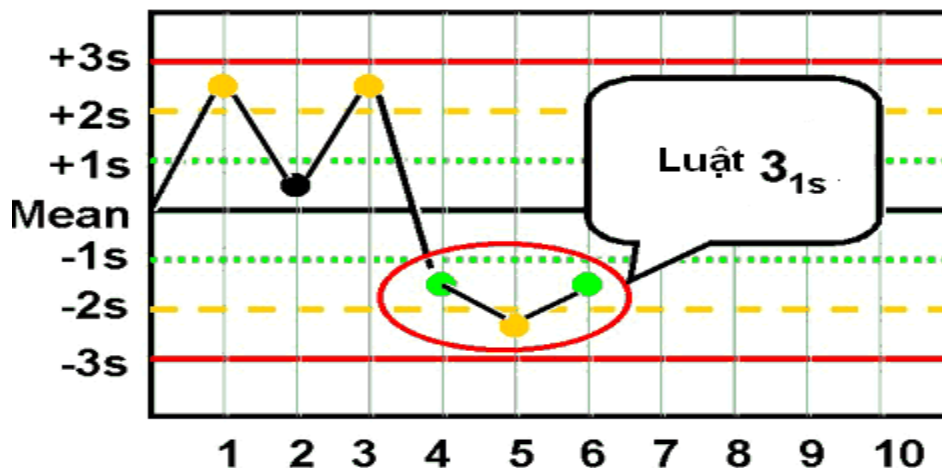
- Trường hợp có 3 mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) thì trong cùng một lần chạy, kết quả của mức mẫu chuẩn thấp và cao vượt ngoài giới hạn +2SD hoặc -2SD còn kết quả của mức mẫu chuẩn trung bình vẫn nằm trong giới hạn $\pm 2SD$, thì lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm hiểu nguyên nhân, thực hiện biện pháp khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.



Luật 3_{1s}: Áp dụng trong trường hợp có 3 mức mẫu chuẩn ở các lần chạy liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng); hoặc trong cùng một lần chạy của các mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) khác nhau:

- Khi 3 kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) cùng nằm trên giới hạn +1SD hoặc dưới giới hạn -1SD, thì kết quả lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.

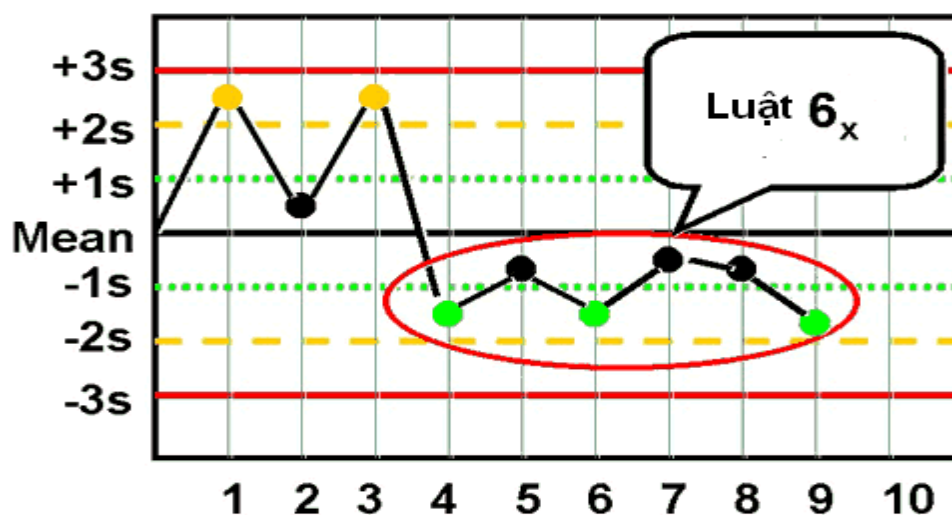
- Khi 3 kết quả của ba mức mẫu chuẩn (hoặc ba mẫu kiểm chứng) trong cùng một lần chạy cùng nằm trên giới hạn +1SD hoặc dưới giới hạn -1SD, thì kết quả lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.



Luật 6_x: Áp dụng trong trường hợp có 3 mức mẫu chứng ở các lần chạy liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) hoặc của ba mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) khác nhau.

- Khi 6 kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) cùng nằm về phía trên hoặc dưới giá trị trung bình thì kết quả lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.

Khi 2 kết quả liên tiếp của mỗi mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) cùng nằm phía trên hoặc dưới giá trị trung bình (ví dụ: 2 kết quả liên tiếp của mức mẫu chứng thấp nằm phía trên giá trị trung bình, 2 kết quả liên tiếp của mức trung bình nằm phía trên giá trị trung bình và 2 kết quả liên tiếp của mức cao cũng nằm phía trên giá trị trung bình) thì kết quả lần chạy này không đạt, đây là lỗi hệ thống, tìm nguyên nhân, khắc phục và chạy lại mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm chứng.



3.4. Các nguyên nhân gây ra lỗi

3.4.1. Lỗi ngẫu nhiên: Có thể do thay đổi dòng điện, pipette, nhà phân phối, tạp nhiễm, thay đổi thể tích, có bọt trong đường ống dẫn sinh phẩm ...

3.4.2. Lỗi hệ thống: Có thể do sự thay đổi lô chất chuẩn máy, thay đổi nhiệt độ của máy ủ, nguồn chiếu sáng bị hỏng, điện từ, lô sinh phẩm thay đổi.

4. Đánh giá chất lượng bên ngoài (EQA) hay ngoại kiểm tra

4.1. Giới thiệu

- Đánh giá chất lượng bên ngoài là rất quan trọng để cải thiện hệ thống chất lượng phòng xét nghiệm và là phương pháp hữu hiệu để phát hiện các vấn đề về quy trình thực hiện trong phòng xét nghiệm nhằm đưa ra biện pháp khắc phục phù hợp để cải thiện chất lượng.

- Tất cả các phòng xét nghiệm nên tham gia vào một chương trình ngoại kiểm tra. Chương trình ngoại kiểm tra có thể được tổ chức ở các mức độ khác

nhau như khu vực, quốc gia hay quốc tế và các chương trình này có thể yêu cầu mất phí hoặc được miễn phí tùy thuộc vào mục đích của từng tổ chức.

- Tổ chức/đơn vị cung cấp mẫu EQA bên ngoài gửi mẫu chưa được biết trước về giá trị (mẫu mù) cho các phòng xét nghiệm tham gia, các kết quả xét nghiệm của các phòng được phân tích, so sánh và báo cáo kết quả sẽ được gửi trả cho các phòng xét nghiệm. Các kết quả EQA của từng phòng xét nghiệm sẽ được giữ bí mật chỉ có đơn vị cung cấp dịch vụ ngoại kiểm và phòng xét nghiệm của chính mình mới được biết kết quả.

- Khi tham gia vào chương trình ngoại kiểm tra, phòng xét nghiệm cần xây dựng quy trình quản lý nhằm đảm bảo rằng tất cả các mẫu EQA đều được thực hiện giống như các mẫu máu của bệnh nhân.

4.2 Quy trình thực hiện mẫu ngoại kiểm tra (EQA)

4.2.1 Nhận mẫu EQA: Phòng xét nghiệm nhận các mẫu ngoại kiểm tra trực tiếp từ đơn vị cung cấp mẫu hoặc thông qua đơn vị đảm bảo chất lượng quốc gia.

4.2.2 Chuẩn bị và phân tích mẫu: Phòng xét nghiệm phải thực hiện phân tích mẫu EQA trong vòng 3-5 ngày kể từ khi nhận mẫu và thực hiện trong cùng đợt xét nghiệm cho bệnh nhân. Quy trình chạy mẫu EQA giống như quy trình thực hiện các mẫu máu của bệnh nhân (theo đúng quy trình của nhà sản xuất);

4.2.3. Ghi chép, báo cáo và lưu hồ sơ

- Các kết quả EQA cần phải được ghi chép vào sổ ngoại kiểm và gửi cho đơn vị đảm bảo chất lượng.

- Các báo cáo đánh giá kết quả EQA cần phải được lưu giữ trong một khoảng thời gian nhất định để có cơ sở đánh giá mức độ cải thiện năng lực của phòng xét nghiệm sau này.

4.2.4 Lưu giữ mẫu EQA: Các mẫu EQA phải được xử lý đúng cách và bảo quản để sử dụng khi cần thực hiện lại.

4.2.5 Nhận kết quả đánh giá từ đơn vị đảm bảo chất lượng: Trong trường hợp PXN có kết quả đánh giá EQA chưa đạt, có vấn đề tiềm ẩn trong luồng công việc cần phải kiểm tra tất cả các khía cạnh trong quy trình và phải đưa ra biện pháp khắc phục.

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

Chọn câu trả lời đúng cho các câu hỏi sau:

1. Mục đích của việc thực hiện Kiểm soát chất lượng:

a. Phòng ngừa các sai sót và để đảm bảo kết quả cuối cùng là đúng.

b. Phát hiện và phòng ngừa sai sót trong quá trình thực hiện xét nghiệm để đảm bảo rằng kết quả cuối cùng là chính xác.

c. Phát hiện, đánh giá và thực hiện các biện pháp khắc phục để đảm bảo rằng kết quả cuối cùng là chính xác.

d. Cả câu (a) và (c)

2. Mẫu chuẩn máy là:

a. Mẫu có thành phần giống như mẫu bệnh phẩm được dùng để đánh giá độ chính xác.

b. Mẫu có thành phần không giống mẫu bệnh phẩm được dùng để đánh giá độ tập chung

c. Mẫu có thành phần giống như mẫu bệnh phẩm được dùng để đánh giá độ tập trung.

d. Mẫu có thành phần không giống như mẫu bệnh phẩm được dùng để đánh giá độ chính xác.

3. Biểu đồ Levey-Jennings là một phương pháp vẽ biểu đồ để:

a. Biểu thị các kết quả nội kiểm tra theo thời gian và đánh giá quy trình xét nghiệm nằm trong mức kiểm soát hay ngoài mức kiểm soát.

b. Đánh giá quy trình xét nghiệm nằm trong mức kiểm soát hay ngoài mức kiểm soát.

c. Nhắc cán bộ xét nghiệm về việc cần phải thực hiện nội kiểm định kỳ và đánh giá quy trình xét nghiệm nằm trong mức kiểm soát hay ngoài mức kiểm soát.

d. Cả 3 câu (a), (b) và (c)

4. Chương trình ngoại kiểm tra là chương trình:

a. Được cán bộ phòng xét nghiệm thực hiện để giám sát kết quả xét nghiệm của các ngày khác nhau.

b. Được thực hiện bởi một cơ quan bên ngoài triển khai để đánh giá định kỳ và mang tính hồi cứu việc thực hiện của phòng xét nghiệm.

c. Được thực hiện bởi một đơn vị độc lập tại đơn vị triển khai để đánh giá định kỳ và mang tính hồi cứu việc thực hiện của phòng xét nghiệm.

d. Được thực hiện bởi ban giám đốc của đơn vị để đánh giá năng lực của cán bộ xét nghiệm.

5. Luật R_{4S} áp dụng:

a. Khi 4 kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng); hoặc của các mức mẫu khác nhau cùng nằm trên giới hạn + 1SD hoặc dưới giới hạn -1SD

b. Khi hai kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) có sự chênh lệch vượt quá $\pm 4SD$.

c. Khi 2 kết quả của 2 mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) cùng nằm trên giới hạn + 2SD hoặc cùng nằm dưới giới hạn -2SD

d. Cả câu (b) và (c)

6. Luật 2:3_{2S} áp dụng:

a. Khi 3 kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) cùng nằm về một phía và trong đó có 2 kết quả liên tiếp hoặc không liên tiếp nằm ngoài giới hạn +2SD hoặc -2SD.

b. Khi 3 kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) cùng nằm ngoài giới hạn +2SD hoặc -2SD.

c. Khi 2 kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) nằm ngoài giới hạn +3SD hoặc -3SD.

d. Khi 3 kết quả liên tiếp của cùng một mức mẫu chuẩn (hoặc mẫu kiểm chứng) cùng nằm về một phía và trong đó có 2 kết quả không liên tiếp nằm ngoài giới hạn +2SD hoặc -2SD.

7. Mẫu ngoại kiểm tra (EQA) được thực hiện:

a. Sau khi máy được hiệu chuẩn.

b. Tương tự như quy trình thực hiện xét nghiệm trên mẫu bệnh nhân.

c. Theo một quy trình riêng do phòng xét nghiệm xây dựng.

d. Trước khi thực hiện xét nghiệm trên mẫu bệnh nhân

8. Lỗi ngẫu nhiên thường gặp ở các luật:

a. Luật 2_{2S} hay 10_x

b. Luật 2_{2S} hay 4_{1S}

c. Luật R_{4S} hay 10_x

d. Luật 1_{3S} hay R_{4S}

Bài 6. QUẢN LÝ THÔNG TIN VÀ HỆ THỐNG BIỂU MẪU BÁO CÁO TRONG XÉT NGHIỆM ĐẾM TẾ BÀO T-CD4

Mục tiêu bài học

Sau khi học xong bài này, học viên có thể:

1. Trình bày được quá trình quản lý, lưu giữ thông tin của quá trình thực hiện xét nghiệm đếm tế bào T-CD4.
2. Hoàn thiện hệ thống biểu mẫu báo cáo theo đúng quy định.
3. Quản lý và lưu giữ thông tin, hồ sơ, sổ sách theo đúng quy định.

Thời gian học tập: 90 phút

Nội dung bài học:

1. Khái niệm thông tin và tầm quan trọng của thông tin trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4

1.1. Khái niệm

- Thông tin là sự phản ánh sự vật, sự việc, hiện tượng của thế giới khách quan và các hoạt động của con người trong đời sống xã hội.

- Thông tin trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 là những thông tin mô tả về các yếu tố liên quan tới xét nghiệm CD4 bao gồm cơ sở xét nghiệm, cán bộ thực hiện xét nghiệm, bệnh nhân được làm xét nghiệm T-CD4, quá trình lấy mẫu, đóng gói, vận chuyển, chuẩn bị xét nghiệm, thực hiện xét nghiệm và trả lời kết quả. Thông tin này có thể mô tả các yếu tố khác nhau trong ngành y tế và ngoài ngành y tế có liên quan đến xét nghiệm T-CD4.

- Quản lý thông tin là một hoạt động nhằm quản lý các sự kiện, hiện tượng. Quản lý thông tin một cách khoa học giúp cho việc tra cứu, chia sẻ và bảo mật trở nên nhanh chóng, dễ dàng và đơn giản hơn. Hệ thống quản lý thông tin là hệ thống cung cấp thông tin cho công tác quản lý của tổ chức bao gồm con người, thiết bị và quy trình thu thập, phân tích, đánh giá và phân phối những thông tin cần thiết, kịp thời, chính xác cho những người có thẩm quyền trong các quyết định về tổ chức và triển khai thực hiện.

1.2. Tầm quan trọng thông tin trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4

- Phản ánh hiện trạng và những công việc đã làm trong suốt quá trình thực hiện xét nghiệm tế bào T-CD4 cho bệnh nhân bao gồm: Trước xét nghiệm, trong xét nghiệm và sau xét nghiệm.

- Đánh giá tiến độ thực hiện và phối hợp các hoạt động.

- Lựa chọn loại dịch vụ cần thiết phù hợp với bệnh nhân nhằm giảm chi phí.

- Giúp cho cán bộ quản lý giám sát, kiểm tra quá trình xét nghiệm, lựa chọn mục tiêu, lựa chọn ưu tiên, hoạch định chính sách, xây dựng tiêu chuẩn để điều phối các hoạt động.

- Quản lý, lưu giữ tốt thông tin của bệnh nhân được thực hiện xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 là tư liệu tốt để:

- + Tiết kiệm thời gian tìm kiếm trong quá trình tra cứu thông tin.

- + Sao chép kết quả hoặc tái thiết thông tin liên quan đến toàn bộ quá trình xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 cho bệnh nhân.

- + Kích hoạt tính năng theo dõi chi tiết và xử lý sự cố.

- + Tối ưu hóa việc theo dõi và điều trị bệnh nhân HIV/AIDS.

- + Làm căn cứ cho việc báo cáo, nghiên cứu khoa học và xây dựng kế hoạch.

2. Các loại thông tin và yêu cầu đối với thông tin trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4

2.1. Các loại thông tin

- Thông tin thường xuyên: Được thu thập qua các sổ sách ghi chép và biểu mẫu báo cáo định kỳ.

- Thông tin không thường xuyên: Được thu thập qua các báo cáo giám sát, báo cáo kỹ thuật, đánh giá, nghiên cứu từ nhiều khía cạnh khác nhau.

2.2. Những yêu cầu đối với thông tin về xét nghiệm T-CD4

- Thông tin phải đầy đủ, toàn diện.

- Thông tin phải chính xác.

- Thông tin phải có tính đặc hiệu.

- Thông tin phản ánh cả số lượng và chất lượng.

2.3 Các giai đoạn thu thập thông tin trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4

- Giai đoạn trước xét nghiệm: bao gồm các thông tin về quá trình lấy mẫu, đóng gói và vận chuyển (chi tiết tham khảo bài “Lấy mẫu, đóng gói, vận chuyển mẫu bệnh phẩm trong xét nghiệm đếm tế bào T-CD4”).

- Giai đoạn xét nghiệm: bao gồm các thông tin về xử lý mẫu bệnh phẩm, phân tích kết quả, thực hiện nội kiểm và ngoại kiểm máy xét nghiệm.

- Giai đoạn sau xét nghiệm: bao gồm các thông tin về sao chép kết quả xét nghiệm từ máy hoặc phiếu trả kết quả vào sổ xét nghiệm, trả kết quả cho bác sĩ/bệnh nhân, việc trao đổi của cán bộ xét nghiệm với bác sĩ lâm sàng và người quản lý, việc lưu giữ thông tin về toàn bộ quá trình xét nghiệm T-CD4 cho bệnh nhân và báo cáo tình hình xét nghiệm T-CD4

3.2. Sổ ghi chép vận chuyển mẫu

Thông tin của người chuyển mẫu:														
Họ và tên:.....														
Điện Thoại:.....														
Tên phòng xét nghiệm nhân mẫu:.....														
STT	Số lượng mẫu	Chương trình - dự án	Lấy mẫu máu		Chuyển mẫu máu		Nhận mẫu máu		Trả/nhận kết quả		Tên đơn vị chuyển mẫu đến	Xác nhận của nơi gửi mẫu	Tên và chữ ký của cán bộ nhận mẫu	Nhận xét
			Giờ	Ngày	Giờ	Ngày	Giờ	Ngày	Giờ	Ngày				
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)

Hướng dẫn ghi chép:

- (1) Số thứ tự chuyển mẫu.
- (2) Số lượng mẫu chuyển đi trong lần vận chuyển.
- (3) Tên của chương trình/dự án tài trợ.
- (4,6,8,10) Giờ lấy máu/chuyển mẫu/nhận mẫu/trả hoặc nhận kết quả.
- (5,7,9,11) Ngày lấy máu/chuyển mẫu/nhận mẫu/trả hoặc nhận kết quả.
- (12) Tên đơn vị chuyển mẫu đến.
- (13) Xác nhận của nơi gửi mẫu.
- (14) Tên và chữ ký của cán bộ tiếp nhận mẫu.
- (15) Nhận xét tình trạng mẫu lúc nhận.

3.3. Sổ theo dõi lý lịch máy

- Các thông tin về máy, thời gian bảo trì sửa chữa.
- Cơ sở thực hiện theo hướng dẫn và lưu tại phòng.

LÝ LỊCH MÁY

Tên thiết bị:..... Mã số.....

Nơi sử dụng.....

Ngày nhận máy:.....

Ngày đưa vào sử dụng:.....

Nhãn hiệu máy (Model):.....

Nước sản xuất:..... Công suất:.....

Số máy (Serial):.....

Nguồn cấp máy:.....

Phụ kiện của máy nếu có (dụng cụ và phụ tùng kèm theo)

STT	Tên phụ tùng	Quy cách	Số lượng	Ghi chú

STT	Ngày, tháng, năm	Mô tả chi tiết hoạt động bảo trì, bảo dưỡng, sửa chữa	Hướng giải quyết	Người thực hiện (ký và ghi rõ họ tên)	Người quản lý thiết bị (ký và ghi rõ họ tên)	Ghi chú

3.4. Báo cáo tình hình xét nghiệm

- Cơ sở xét nghiệm thực hiện báo cáo định kỳ hàng tháng gửi về Trung tâm Phòng, chống HIV/AIDS trước ngày cuối cùng của tháng;
- Trung tâm Phòng, chống HIV/AIDS gửi báo cáo về Cục Phòng, chống HIV/AIDS trước ngày 05 hàng tháng.

SỞ Y TẾ				CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM								
TRUNG TÂM PHÒNG CHỐNG HIV/AIDS				Độc lập - Tự do - Hạnh phúc								
				Ngày			tháng			năm 20		
<i>Kính gửi: Cục Phòng, chống HIV/AIDS</i>												
BÁO CÁO TÌNH HÌNH XÉT NGHIỆM CD4												
Tên cơ sở xét nghiệm				Ngày báo cáo								
Quận/Huyện				Báo cáo tháng								
Tỉnh/thành phố				Tổng số mẫu bệnh phẩm nhận được trong tháng								
Họ và tên, điện thoại, email cán bộ lập báo cáo				Tổng số xét nghiệm được thực hiện trong tháng								
				Tổng số xét nghiệm thực hiện tích lũy theo năm								
				Dự trữ số xét nghiệm trong tháng tới								
STT	Tên sinh phẩm/vật dụng xét nghiệm	Đơn vị tính	Số lô	Hạn dùng	Tồn đầu kỳ	Nhận trong tháng	Chuyển trong tháng	Sử dụng trong tháng	Số lượng hư hao	Số lượng hết hạn trong vòng 3 tháng tới	Tồn cuối kỳ	Tổng sử dụng trong tháng
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
Nơi nhận: - Như trên												
- Sở Y tế (để báo cáo);												
- Lưu đơn vị												
Ghi chú: - Tổng SD trong tháng = Sử dụng trong tháng + Hông/hết hạn, hư hao												
Người lập báo cáo						THỦ TRƯỞNG ĐƠN VỊ						
(ký tên)						(ký tên và đóng dấu)						

(1) Số thứ tự.

(2) Tên sinh phẩm/ vật dụng xét nghiệm: Điền tên các hoá chất, các vật dụng xét nghiệm cần có tùy theo từng loại máy của phòng xét nghiệm.

(3) Đơn vị tính: Ghi rõ: ống, cái, chiếc, hộp, bình...

(4) Số lô: Điền đầy đủ số lô của loại sinh phẩm tương ứng có tại cơ sở.

(5) Hạn dùng: Điền ngày hết hạn của sản phẩm (thường là thông tin ngày tháng sau chữ Exp. hoặc "Expiry date").

(6) Tồn đầu kỳ: Số lượng sinh phẩm/ vật dụng xét nghiệm vào đầu tháng báo cáo. Tồn đầu kỳ của mỗi tháng chính là tồn cuối kỳ của tháng liền kề trước đó.

(7) Nhận trong tháng: Số lượng sinh phẩm/ vật dụng xét nghiệm nhận được trong tháng báo cáo từ phân phối thường kỳ hoặc điều chuyển từ cơ sở khác.

(8) Chuyển trong tháng: Số lượng sinh phẩm/ vật dụng xét nghiệm điều chuyển cho các cơ sở khác.

(9) Sử dụng trong tháng: Số lượng sinh phẩm/vật dụng xét nghiệm sử dụng cho công tác xét nghiệm tại phòng xét nghiệm hoặc chuyển tới phòng khám (ống EDTA, kim 2 đầu ...).

(10) Số lượng hư hao: Số lượng hư hao bao gồm sinh phẩm/vật dụng xét nghiệm bị hỏng trước hoặc trong quá trình sử dụng và sinh phẩm/vật dụng xét nghiệm sử dụng trong quá trình làm lại xét nghiệm.

(11) Số lượng sẽ hết hạn trong vòng 3 tháng tới.

(12) Tồn cuối kỳ:

- Số lượng sinh phẩm/vật dụng xét nghiệm còn lại vào cuối kỳ chốt báo cáo (theo số liệu kiểm kho).

- Theo lý thuyết, tồn cuối kỳ = tồn đầu kỳ + nhận trong kỳ - sử dụng - hư hao.

(13) Tổng sử dụng trong tháng: (13) = (9) + (10)

3.5. Phiếu theo dõi nhiệt độ

Cơ sở xét nghiệm thực hiện việc theo dõi độ ẩm, nhiệt độ Phòng, nhiệt độ tủ lạnh lưu giữ hóa chất, sinh phẩm theo quy định.

3.6. Hồ sơ theo dõi nội kiểm (IQC), ngoại kiểm tra (EQA)

- Phòng xét nghiệm phải thực hiện lưu giữ kết quả nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định.

- Cơ sở y tế triển khai xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 phải báo cáo kết quả nội kiểm, ngoại kiểm theo quy định.

4. Chế độ lưu giữ thông tin

- Cơ sở y tế có trách nhiệm lưu giữ hồ sơ, sổ sách theo đúng quy định của nhà nước về Quy định lưu giữ thông tin tại Thông tư số 09/2011/TT BNV ngày 03/6/2012 của Bộ Nội Vụ về “Quy định về thời hạn bảo quản hồ sơ, tài liệu hình ảnh phổ biến trong hoạt động của các cơ quan tổ chức.

- Hồ sơ lưu giữ là những tài liệu cụ thể rõ ràng ở dạng văn bản viết, văn bản in hay file điện tử cho thấy bằng chứng của quá trình hoạt động xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trong phòng xét nghiệm.

- Toàn thể nhân viên làm việc tại phòng xét nghiệm có trách nhiệm lưu giữ hồ sơ, sổ sách trong phạm vi được phân công quản lý.

- Toàn bộ hồ sơ, sổ sách được cất giữ trong những bìa, hộp thích hợp, có chỉ mục rõ ràng, sắp xếp và bảo quản và dễ dàng tiếp cận.

- Quy định về thời gian lưu giữ tài liệu

STT	Tài liệu	Thời gian lưu giữ
1	Phiếu yêu cầu xét nghiệm	05 năm
2	Kết quả xét nghiệm in ra từ máy	02 năm
3	Sổ xét nghiệm T-CD4	10 năm
4	Sổ ghi chép vận chuyển mẫu	10 năm
5	Sổ theo dõi lý lịch máy	Tới thời điểm thanh lý máy
6	Phiếu theo dõi nhiệt độ	01 năm
7	Các báo cáo liên quan đến xét nghiệm đếm tế bào T-CD4	10 năm

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

Câu 1: Thông tin về xét nghiệm T-CD4:

- a. Phản ánh hiện trạng và những công việc đã làm trong suốt quá trình thực hiện (trước, trong và sau) xét nghiệm tế bào T-CD4 cho bệnh nhân.
- b. Đánh giá tiến độ hoạt động và phối hợp các hoạt động, chọn loại dịch vụ cần thiết phù hợp với bệnh nhân và giảm chi phí.
- c. Giúp cho cán bộ quản lý giám sát, kiểm tra quá trình xét nghiệm, lựa chọn mục tiêu, chọn ưu tiên, hoạch định chính sách, xây dựng tiêu chuẩn để điều phối dịch vụ.
- d. Cả 3 ý trên đều đúng

Câu 2: Lưu giữ tốt thông tin của bệnh nhân làm xét nghiệm T-CD4 để:

- a. Sao chép kết quả hoặc tái thiết thông tin liên quan đến toàn bộ quá trình xét nghiệm T-CD4 cho bệnh nhân, theo dõi chi tiết và xử lý sự cố, tối ưu hóa việc chẩn đoán và điều trị bệnh nhân HIV/AIDS, có tác dụng quan trọng trong công tác nghiên cứu khoa học.
- b. Sao chép kết quả hoặc tái thiết thông tin liên quan đến toàn bộ quá trình xét nghiệm T-CD4 cho bệnh nhân, kích hoạt tính năng theo dõi chi tiết và xử lý sự cố, tối ưu hóa việc theo dõi và điều trị bệnh nhân HIV/AIDS, có tác dụng quan trọng trong công tác nghiên cứu khoa học.

Câu 3: Thông tin về xét nghiệm T-CD4 là:

- a. Những thông tin mô tả về các yếu tố liên quan đến cơ sở xét nghiệm, người thực hiện xét nghiệm và bệnh nhân làm xét nghiệm T-CD4.

b. Những thông tin này mô tả cả các yếu tố khác nhau trong ngành y tế và ngoài ngành y tế có liên quan đến xét nghiệm T-CD4.

c. Cả 1 và 2 đều đúng.

Câu 4: Sổ nào sau đây cần lưu giữ trong giai đoạn trước xét nghiệm

a. Sổ giao nhận mẫu

b. Sổ xét nghiệm

c. Sổ trả kết quả

Câu 5: Thời gian lưu giữ kết quả xét nghiệm in ra từ máy.

a. 6 tháng

b. 1 năm

c. 2 năm

d. 5 năm

Câu 6: Sổ nào sau đây cần lưu giữ trong giai đoạn xét nghiệm

a. Sổ giao nhận mẫu

b. Sổ xét nghiệm

c. Sổ trả kết quả

Câu 7: Người chịu trách nhiệm lưu giữ hồ sơ, sổ sách trong phòng xét nghiệm

a. Tất cả nhân viên

b. Cán bộ trực tiếp thực hiện xét nghiệm

c. Nhân viên được phân công

Câu 8: Thời gian lưu giữ sổ lý lịch máy

a. 2 năm

b. 5 năm

c. 10 năm

d. Tới thời điểm thanh lý máy

Bài 7. AN TOÀN SINH HỌC TRONG XÉT NGHIỆM ĐẾM TẾ BÀO T-CD4

Mục tiêu bài học:

Sau khi học xong học viên có thể trình bày:

1. Các quy định và hướng dẫn về an toàn trong công tác lấy máu và vận chuyển mẫu xét nghiệm CD4.
2. Các quy định về an toàn phòng xét nghiệm và các qui định về quản lý mẫu bệnh phẩm và xử lý chất thải.
3. Các quy định và hướng dẫn giải quyết sự cố khi xảy ra tai nạn trong quá trình công tác.

Thời gian học tập: 180 phút

Nội dung bài học:

1. Hướng dẫn an toàn trong quá trình lấy mẫu và vận chuyển

1.1. Mục đích

- Đảm bảo an toàn sinh học và tránh nguy cơ phơi nhiễm trong quá trình lấy máu và vận chuyển mẫu.
- Bảo vệ các mẫu bệnh phẩm tránh bị nhiễm chéo, bị hư hỏng.
- Đảm bảo nguồn lây không bị phát tán ra môi trường.

1.2. Nguyên tắc an toàn đối với nhân viên lấy máu

Tất cả các mẫu bệnh phẩm xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 được xác định là dương tính với HIV, do đó phải tuyệt đối tuân thủ các qui định về an toàn sinh học:

- Phải sử dụng găng tay khi tiếp xúc trực tiếp với máu của bệnh nhân.
- Khi có vết thương hở hoặc các tổn thương da rỉ nước, phải băng kỹ và tốt nhất không tiếp xúc với máu cho đến khi vết thương lành.
- Phải bỏ kim và bơm kim tiêm vào hộp đựng dụng cụ sắc nhọn.
- Những ống đựng máu phải được đậy kín. Thành ngoài ống phải được lau chùi sạch (không được dính máu) bằng các dung dịch tẩy uế như hypochlorit 0,1% chất clo (1gr/lít).
- Khi máu dính trên mặt bàn hay mặt sàn, công việc đầu tiên là phải lấy giấy hay vải có thể hút nước đắp lên. Sau đó đổ xung quanh chỗ bị đổ vỡ bằng các dung dịch sát khuẩn như Javel, dung dịch có clo.... Rồi đổ lên chỗ giấy hay

vải hút nước và để 20 phút. Tiếp đó dùng khăn thấm khô rồi rửa sạch theo thường quy.

- Phải rửa tay bằng xà phòng và nước sau khi lấy máu xong.
- Khi tay hoặc cơ thể bị nhiễm máu hoặc khi da bị đâm hay bị đứt phải xử lý đúng quy định xử lý phơi nhiễm.

1.3. Dụng cụ an toàn cho người vận chuyển mẫu

- Găng tay dùng một lần, khẩu trang, chất tẩy trùng để rửa tay và da (cồn 70%, chlorhexadine hoặc xà phòng dettol).
- Sổ giao nhận mẫu, phiếu xét nghiệm và các giấy tờ liên quan.
- Dán cảnh báo “NGUY HIỂM SINH HỌC” trên thùng vận chuyển mẫu, nắp thùng phải có chốt hoặc được hàn kín (bằng băng dính), mang theo dung dịch tẩy trùng, vật liệu thấm hút và túi nylon dày chuyên dụng cho rác thải sinh học dùng trong trường hợp mẫu máu bị đổ hoặc tuýp đựng máu bị vỡ.
- Chất tẩy trùng 10% - được pha mới /chuẩn bị (trong vòng 24 giờ).
- Vật liệu thấm hút để lau chùi - giấy lau mềm.
- Túi nylon dày chuyên dụng (không bị đâm thủng, rò rỉ).

Cảnh báo được dán trên thùng vận chuyển – “NGUY HIỂM SINH HỌC”



Thùng đựng mẫu bệnh phẩm

2. Bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm

Phòng xét nghiệm (PXN)

Phòng xét nghiệm là nơi thực hiện các xét nghiệm về sinh học, vi khuẩn, virus, miễn dịch, hoá học, huyết học, miễn dịch huyết học, sinh lý học, tế bào học và bệnh học liên quan với bệnh phẩm từ người, cho mục đích cung cấp những thông tin về chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa bệnh hoặc đánh giá tình trạng sức khoẻ của người, còn là nơi hỗ trợ để điều tra về tình hình về bệnh và những định hướng điều tra thích hợp khác tiếp theo.

An toàn sinh học phòng xét nghiệm (ATSH PXN)

- Là thuật ngữ được sử dụng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết để ngăn ngừa những phơi nhiễm không mong muốn hoặc làm thất thoát tác nhân gây bệnh (TNGB) và độc tố.

- Nhân viên phòng xét nghiệm luôn phải đối mặt với nguy cơ bị lây nhiễm tác nhân gây bệnh. Do vậy phòng xét nghiệm phải bảo đảm các điều kiện an toàn sinh học phù hợp với từng cấp độ và chỉ được tiến hành xét nghiệm trong phạm vi chuyên môn sau khi được cơ quan thẩm quyền về y tế cấp giấy chứng nhận đạt tiêu chuẩn an toàn sinh học.

- Nhân viên phòng xét nghiệm tiếp xúc với tác nhân gây bệnh truyền nhiễm phải được đào tạo về kiến thức chuyên môn, kỹ năng thực hành và trang bị phòng hộ cá nhân để phòng lây nhiễm tác nhân gây bệnh truyền nhiễm.

2.1. Nguyên tắc chung về an toàn sinh học

Việc xác định một cấp độ ATSH cho một phòng xét nghiệm cần quan tâm đến vi sinh vật được xét nghiệm, thiết bị sẵn có cũng như các tiêu chuẩn thực hành và các quy trình cần thiết để tiến hành công việc trong phòng xét nghiệm một cách an toàn. Mối liên quan giữa nhóm nguy cơ vi sinh vật và cấp độ ATSH của phòng xét nghiệm được thể hiện trong bảng sau:

Nhóm nguy cơ	Cấp độ ATSH	Áp dụng	Tiêu chuẩn thực hành	Cơ sở vật chất/ trang thiết bị ATSH
1 (không có hoặc nguy cơ lây nhiễm cá thể và cộng đồng thấp)	Cấp 1 (BSL1)	Nghiên cứu và giảng dạy cơ bản	Kỹ thuật vi sinh tốt (GMT)	Không có gì yêu cầu gì đặc biệt, bàn làm xét nghiệm thông thường
2 (có nguy cơ)	Cấp 2 (BSL2)	Dịch vụ chăm sóc	GMT và sử dụng quần áo	Bàn xét nghiệm; tủ ATSH khi thực hiện xét

Nhóm nguy cơ	Cấp độ ATSH	Áp dụng	Tiêu chuẩn thực hành	Cơ sở vật chất/ trang thiết bị ATSH
lây nhiễm cho cá thể nhưng ít có nguy cơ lây nhiễm cho cộng đồng)		sức khoẻ ban đầu; cơ sở chẩn đoán và nghiên cứu	bảo hộ, có các biển báo nguy hiểm sinh học	nghiệm có nguy cơ tạo khí dung
3 (nguy cơ lây nhiễm cho cá thể cao, nguy cơ lây nhiễm cho cộng đồng thấp)	Cấp 3 (BSL3)	Dịch vụ chẩn đoán đặc biệt, nghiên cứu	Như cấp độ 2 và sử dụng thêm áo quần bảo hộ đặc biệt, kiểm soát lối vào, luồng khí định hướng	Tủ ATSH và/hoặc dụng cụ cơ bản cho tất cả các hoạt động
4 (nguy cơ lây nhiễm cho cá thể và cộng đồng cao)	Cấp 4 (BSL4)	Đơn vị có bệnh phẩm thật nguy hiểm	Như cấp 3 và có thêm lối vào khóa khí, tắm trước khi ra, loại bỏ chất thải chuyên dụng	Tủ ATSH cấp 3 hoặc quần áo bảo hộ áp lực dương cùng với tủ ATSH cấp 2, nồi hấp hai cửa, lọc khí cấp, khí thải

Liên quan giữa nhóm nguy cơ vi sinh vật và cấp độ ATSH của PXN

Phòng xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 được phân loại là phòng xét nghiệm làm việc với tác nhân sinh học thuộc nhóm nguy cơ 2. Do đó phòng xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 phải tuân thủ các quy định cho phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp 2 với hệ thống cửa đóng và có biển báo phù hợp. Chất thải mang mầm bệnh được tách riêng khỏi thùng chất thải thông thường.

2.2. Yêu cầu đối với nhân viên phòng xét nghiệm đếm tế bào T-CD4

Nhân viên phải mặc áo choàng của phòng xét nghiệm, áo khoác dài hoặc đồng phục trong suốt thời gian làm việc trong phòng xét nghiệm.

- Nhân viên phải đeo găng tay trong quá trình làm xét nghiệm và sau khi sử dụng, găng tay phải được tháo bỏ đúng cách (lộn trái), và phải rửa tay.

- Nhân viên phải rửa tay kỹ bằng xà phòng/dung dịch rửa có phổ kháng khuẩn rộng sau mỗi lần thao tác, và trước khi rời khỏi khu vực làm việc trong phòng xét nghiệm.

- Sử dụng kính bảo hộ, mặt nạ hoặc các thiết bị bảo hộ khác khi thực hiện xét nghiệm để tránh dung dịch xét nghiệm hoặc mẫu xét nghiệm bắn vào mắt, mặt
- Nghiêm cấm việc mặc quần áo phòng hộ ra ngoài phòng thí nghiệm, ví dụ như ở nhà ăn, phòng nghỉ, phòng giải lao, nơi làm việc, thư viện, phòng họp, phòng nhân viên và phòng vệ sinh.
- Áo quần nhiễm trùng phải được khử trùng bằng phương pháp thích hợp.
- Không được dùng giày, dép hở ngón chân trong phòng xét nghiệm.
- Nghiêm cấm ăn, uống, hút thuốc lá, sử dụng mỹ phẩm, đeo và tháo kính áp tròng trong phòng xét nghiệm.
- Các quần áo bảo hộ được sử dụng không được để chung vào ngăn hoặc tủ đựng quần áo sạch và quần áo mặc thông thường

3. Sự cố an toàn sinh học

Xử lý sự cố và khắc phục hậu quả sự là tình trạng có lỗi về tính năng của thiết bị an toàn trong phòng xét nghiệm hoặc rò rỉ, phát tán vi sinh vật trong phòng xét nghiệm hoặc từ phòng xét nghiệm ra bên ngoài. Sự cố an toàn sinh học bao gồm hai mức độ:

Sự cố an toàn sinh học mức độ ít nghiêm trọng là sự cố xảy ra trong phạm vi phòng xét nghiệm nhưng ít có nguy cơ làm lây nhiễm cho nhân viên phòng xét nghiệm và phòng xét nghiệm có đủ khả năng để kiểm soát.

Sự cố an toàn sinh học mức độ nghiêm trọng là sự cố xảy ra trong phạm vi phòng xét nghiệm nhưng có nguy cơ cao làm lây nhiễm cho nhân viên phòng xét nghiệm và cộng đồng hoặc sự cố mà phòng xét nghiệm không có đủ khả năng để kiểm soát.

Cán bộ xét nghiệm phải được cảnh báo về các sự cố có thể xảy ra và được hướng dẫn xử lý các sự cố. Các hướng dẫn cụ thể sẽ được đề cập trong khóa huấn luyện về an toàn sinh học. Nguyên tắc xử lý trong trường hợp xảy ra sự cố như sau:

- Xử lý tại chỗ theo đúng quy trình.
- Ghi chép lại sự cố, biện pháp xử lý đã thực hiện.
- Báo cáo người phụ trách phòng xét nghiệm về sự cố này.

3.1. Xử lý sự cố bị vật sắc nhọn đâm vào tay trong khi làm việc với tác nhân gây bệnh:

- Báo với đồng nghiệp làm việc gần đó (nếu có).
- Rửa nước tối thiểu trong vòng 5 phút (không nặn máu)

- Sử dụng băng gạc để che vết thương.
- Rời khỏi phòng xét nghiệm.
- Ghi chép và báo cáo sự việc với người chịu trách nhiệm quản lý phòng xét nghiệm.

3.2. Xử lý sự cố làm đổ dung dịch chứa tác nhân gây bệnh trong tủ an toàn sinh học

Các phòng xét nghiệm nên chuẩn bị trước hộp dụng cụ xử lý đánh đổ dung dịch có chứa tác nhân gây bệnh. Trong hộp này cần có dung dịch khử nhiễm, giấy thấm, panh, kẹp, túi đựng chất thải lây nhiễm, trang bị bảo hộ cá nhân phù hợp. Các dụng cụ này phải làm bằng các vật liệu không bị ăn mòn bởi các hóa chất trong phòng xét nghiệm.

Khi đánh đổ dung dịch chứa tác nhân gây bệnh trong tủ an toàn sinh học, người làm xét nghiệm không được tắt tủ và tiến hành các bước sau:

- Báo với đồng nghiệp đang làm việc gần đó (nếu có).
- Để cho tủ hoạt động 10 phút trước khi tiến hành các biện pháp xử lý đảm bảo cho tất cả các khí dung đã được lọc qua màng lọc HEPA của tủ.
- Thay găng tay sạch và đi lấy bộ xử lý sự cố đổ mẫu.
- Dùng giấy thấm phủ lên dung dịch bị đổ, đổ hóa chất khử trùng (dung dịch NaClO 0,5%), để khoảng 30 phút cho chất khử trùng phát huy tác dụng.
- Thu nhặt vật sắc nhọn (nếu có) bằng kẹp bỏ vào hộp đựng vật sắc nhọn.
- Dùng kẹp thu nhặt giấy thấm cho vào túi đựng chất thải lây nhiễm để tiệt trùng.
- Lau bề mặt làm việc của tủ an toàn sinh học.
- Kết thúc quá trình xử lý.
- Sau khi kết thúc xét nghiệm và ra khỏi phòng xét nghiệm, phải ghi chép, báo cáo sự việc với nhân viên phụ trách an toàn sinh học và nhân viên quản lý phòng xét nghiệm.

3.3. Xử lý sự cố đổ dung dịch chứa tác nhân gây bệnh lên sàn nhà, bàn xét nghiệm hoặc trong quá trình vận chuyển

Khi đánh đổ dung dịch chứa tác nhân gây bệnh lên sàn nhà, mặt bàn xét nghiệm hoặc trong quá trình vận chuyển mẫu, cán bộ xét nghiệm/vận chuyển mẫu cần tiến hành các bước xử lý như sau:

- 1) Ngay lập tức cảnh báo cho đồng nghiệp/người đang làm việc trong cùng phòng xét nghiệm/khu vực xảy ra sự cố.

2) Thay/mang găng tay sạch và quần áo bảo hộ nếu dung dịch máu bắn lên quần áo.

3) Nhặt các vật sắc nhọn nếu có bằng kẹp.

4) Phủ giấy thấm lên toàn bộ bề mặt có dung dịch bị đổ theo trình tự từ ngoài vào trong.

5) Đổ hóa chất khử trùng (dung dịch Bleach pha loãng 10 lần hoặc NaClO 0,5%, còn 70%) lên chỗ đã được phủ giấy thấm theo chiều từ ngoài vào trong.

6) Đợi 30 phút.

7) Thu giấy thấm và các vật dụng lây nhiễm cho vào túi đựng rác thải để thực hiện việc tiệt trùng.

8) Vệ sinh, xả nhiều nước vào khu vực mẫu bị đổ (nếu cần thiết lặp lại từ bước 2 đến 5), lau sạch khu vực bị đổ vỡ.

9) Vệ sinh thùng vận chuyển với cùng loại chất khử trên và nước.

10) Sau khi tẩy trùng thành công, báo cáo sự cố với người có thẩm quyền và thông báo với họ rằng khu vực có mẫu bị tràn/xảy ra sự cố đã được tẩy trùng.

4. An toàn hóa học, lửa, điện, bức xạ và trang thiết bị

Nhân viên phòng xét nghiệm vi sinh vật không những bị phơi nhiễm vi sinh vật gây bệnh mà còn có khả năng nhiễm các loại hóa chất. Để phòng vệ cho người thực hiện xét nghiệm cũng như cho cộng đồng, cần phải có trang thiết bị bảo hộ cho người làm xét nghiệm phù hợp đối với từng loại tác nhân gây bệnh khác nhau. Ngoài ra, cũng cần có trang thiết bị bảo hộ để tránh các tai nạn có thể xảy ra trong quá trình làm việc., hạn chế đến mức thấp nhất các sai sót có thể xảy ra trong quá trình xét nghiệm, cần tuân thủ các nguyên tắc thực hành tốt trong phòng xét nghiệm với ba giai đoạn của xét nghiệm là: (1) giai đoạn trước xét nghiệm; (2) giai đoạn xét nghiệm; (3) giai đoạn sau xét nghiệm.

- Nhân viên phòng xét nghiệm cần có những kiến thức về tính độc của những loại hoá chất này, kiểu tiếp xúc và những mối nguy hiểm có thể xảy ra khi sử dụng và bảo quản. Dữ liệu an toàn nguyên vật liệu hay thông tin về các hoá chất nguy hiểm đều được các nhà sản xuất hoặc nhà cung cấp đưa ra. Khi thực hiện xét nghiệm liên quan đến sinh phẩm, hoá chất, người làm xét nghiệm cần sử dụng sinh phẩm và hoá chất theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất, không sử dụng lẫn lộn sinh phẩm, hoá chất của bộ sinh phẩm này lẫn với sinh phẩm và hoá chất của bộ sinh phẩm khác. Các phòng xét nghiệm có sử dụng những hóa chất nguy hiểm cần tìm hiểu những thông tin này.

- Sau một thời gian sử dụng, sự sai lệch không an toàn của một số dụng cụ, trang thiết bị sử dụng trong phòng xét nghiệm có thể xảy ra. Việc kiểm tra thường

xuyên tất cả, định kỳ độ chính xác của dụng cụ, trang thiết bị sử dụng trong phòng xét nghiệm, các thiết bị điện, kể cả hệ thống nối đất là rất cần thiết. Tất cả thiết bị điện và hệ thống đường dây điện cần tuân thủ các tiêu chuẩn và quy định về an toàn điện quốc gia.

- Ngoài ra, cần lắp đặt đường dây điện, ổ cắm phải cao hơn nền phòng xét nghiệm khoảng 40 cm, không gần chỗ có vòi nước. Mỗi phòng xét nghiệm cần có cầu dao, cầu chì hay automat để có thể cắt điện khi cần thiết.

5. Quản lý mẫu bệnh phẩm

Phòng xét nghiệm phải **đáp ứng các tiêu chuẩn** về thu thập, vận chuyển, bảo quản, lưu giữ, sử dụng, nghiên cứu, trao đổi và tiêu hủy mẫu bệnh phẩm liên quan đến tác nhân gây bệnh truyền nhiễm và phải **tuân thủ quy định** về chế độ quản lý mẫu bệnh phẩm. Phòng xét nghiệm phải có đủ điều kiện mới được bảo quản, lưu giữ, sử dụng, nghiên cứu, trao đổi và tiêu hủy mẫu bệnh phẩm của bệnh truyền nhiễm, thực hiện theo quy định tại Thông tư số 43/2011/TT-BYT ngày 05/12/2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc Quy định chế độ quản lý mẫu bệnh phẩm bệnh truyền nhiễm.

6. Xử lý rác thải

- Rác thải y tế bao gồm mẫu bệnh phẩm loại bỏ trong quá trình xét nghiệm, chất thải trong quá trình xét nghiệm cần được phân loại và xử lý theo đúng quy định về an toàn sinh học để tránh lây lan trong phòng xét nghiệm và làm ô nhiễm trong cộng đồng.

- Việc phân loại, trang bị dụng cụ đựng rác và xử lý các loại chất thải từ phòng xét nghiệm phải đáp ứng các tiêu chuẩn về xử lý chất thải bệnh viện thực hiện theo quy định tại Quyết định số 43/2007/QĐ-BYT ngày 30/11/2007 của Bộ Y tế về việc ban hành quy chế quản lý chất thải y tế.

7. Quy chuẩn kỹ thuật về an toàn sinh học phòng xét nghiệm

- Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm quy định cụ thể quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về những kỹ thuật xét nghiệm thực hành tại phòng xét nghiệm.

- Các cơ sở xét nghiệm đã hoạt động trước cần có kế hoạch cải tạo đáp ứng đủ các điều kiện các điều kiện an toàn sinh học phù hợp với từng cấp độ theo quy định, cơ sở xét nghiệm xây dựng mới phải đáp ứng đúng các điều kiện quy định an toàn sinh học phù hợp với từng cấp độ theo quy định này.

8. Tổ chức quản lý

- Lãnh đạo Trung tâm, nhân viên phụ trách phòng xét nghiệm và tất cả những nhân viên y tế trong phòng xét nghiệm phải có **chứng chỉ đã được đào**

tạo về an toàn sinh học, tùy theo yêu cầu công việc phải có đủ kiến thức hoặc kỹ năng cần thiết.

- Trên cơ sở các quy định của Nhà nước và Bộ Y tế, mỗi phòng xét nghiệm cần ban hành quy định an toàn sinh học của phòng xét nghiệm và thực hiện đúng các quy định này.

- Cần **phân công một người phụ trách về an toàn sinh học**. Người phụ trách an toàn sinh học có nhiệm vụ lập kế hoạch bảo đảm an toàn sinh học, theo dõi, giám sát và định kỳ báo cáo lãnh đạo phòng xét nghiệm về các vấn đề liên quan đến an toàn sinh học.

- Cán bộ, nhân viên phòng xét nghiệm cần được **kiểm tra sức khỏe** trước khi vào làm việc tại phòng xét nghiệm và định kỳ hằng năm, được tiêm phòng hoặc khuyến cáo về việc tiêm phòng các bệnh truyền nhiễm mà họ có nguy cơ bị phơi nhiễm khi làm việc trong phòng xét nghiệm.

- Trường hợp nghi ngờ bị phơi nhiễm hoặc nhiễm bệnh phải được theo dõi, điều trị, báo cáo, chăm sóc, cách ly... theo hướng dẫn của ngành Y tế.

9. Thực hành tốt trong phòng xét nghiệm.

9.1 Yêu cầu về an toàn sinh học

Nhân viên phòng xét nghiệm cần được đào tạo về an toàn sinh học, nắm vững được bảng phân loại các tác nhân sinh học. Hiểu rõ được mức độ nguy hiểm về khía cạnh an toàn sinh học, liên quan đến tác nhân gây bệnh trong các giai đoạn thực hiện của quá trình xét nghiệm.

9.2 Yêu cầu về kỹ năng thực hành của phòng xét nghiệm

Tất cả nhân viên phòng xét nghiệm cần được đào tạo về kỹ thuật chuyên môn, cũng như kiến thức cần thiết khác liên quan đến việc sử dụng dụng cụ, trang thiết bị phòng xét nghiệm để có thể làm chủ được dụng cụ, trang thiết bị trong quá trình thực hiện xét nghiệm.

Mặt khác, đào tạo để có kiến thức về các quy định đảm bảo chất lượng phòng xét nghiệm và quản lý chất lượng phòng xét nghiệm.

Phòng xét nghiệm đảm bảo chất lượng xét nghiệm bằng cách thực hiện xét nghiệm trong một điều kiện được kiểm soát, bao gồm:

- Triển khai các quy trình trước xét nghiệm một cách thích hợp
- Điều kiện về môi trường, thiết bị, vật liệu và hệ thống thông tin,
- Sử dụng các quy trình đã được chấp nhận.

- Đánh giá chất lượng xét nghiệm nhằm xác định những vấn đề sai sót có thể xảy ra, kiểm soát tính phù hợp của kết quả, duy trì và củng cố chất lượng xét nghiệm cho tất cả xét nghiệm.

Trên đây là những cơ sở cho xét nghiệm viên có thể hiểu chức năng, nhiệm vụ và chấp hành các quy trình chuyên môn kỹ thuật và ATSH trong công tác xét nghiệm để hoàn thành nhiệm vụ và phòng lây nhiễm tác nhân gây bệnh truyền nhiễm, đảm bảo an toàn trong lĩnh vực hoạt động được giao .

10. Xử trí sau phơi nhiễm với HIV

10.1 Các dạng phơi nhiễm

Nhân viên y tế đang thi hành nhiệm vụ bị phơi nhiễm HIV khi: *Tiếp xúc trực tiếp với máu, sản phẩm máu và các dịch tiết của mẫu bệnh phẩm có HIV, có nguy cơ bị phơi nhiễm HIV.*

Các dạng phơi nhiễm với HIV khi đang thi hành nhiệm vụ:

- Máu, bệnh phẩm/mẫu máu nhiễm HIV bắn vào các vùng da bị tổn thương (bong, vết loét, xây xước từ trước) hoặc bắn vào niêm mạc (mắt, mũi, họng ...).

- Tổn thương qua da do các ống đựng máu hoặc chất dịch của người nhiễm HIV bị vỡ đâm vào.

- Vết thương do bị bơm kim tiêm hoặc các dụng cụ sắc nhọn đã hoặc đang dùng cho người nhiễm HIV đâm vào.

10.2 Quy trình xử trí sau phơi nhiễm:

Bao gồm các bước sau:

- Bước 1: Xử lý vết thương tại chỗ.

- Bước 2: Báo cáo người phụ trách và làm biên bản (chú ý ghi đầy đủ các thông tin yêu cầu trong Hồ sơ phơi nhiễm).

- Bước 3: Đánh giá nguy cơ phơi nhiễm theo mức độ tổn thương và diện tích tiếp xúc.

- Bước 4: Xác định tình trạng HIV của nguồn gây phơi nhiễm.

- Bước 5: Xác định tình trạng HIV của người bị phơi nhiễm.

- Bước 6: Tư vấn cho người bị phơi nhiễm.

- Bước 7: Điều trị dự phòng bằng thuốc ARV.

10.2.1. Xử lý vết thương tại chỗ

- Tổn thương da chảy máu:

+ Xối ngay vết thương dưới vòi nước.

- + Để vết thương tự máu trong một thời gian ngắn, không nặn bóp vết thương.
- + Rửa kỹ bằng xà phòng và nước sạch,
- Phơi nhiễm qua niêm mạc mắt: Rửa mắt bằng nước cất hoặc nước muối NaCl 0,9% liên tục trong 5 phút.
- Phơi nhiễm qua miệng, mũi:
 - + Rửa, nhỏ mũi bằng nước cất hoặc dung dịch NaCl 0,9 %.
 - + Xúc miệng bằng dung dịch NaCl 0,9 % nhiều lần.

10.2.2. Báo cáo người phụ trách và làm biên bản:

Nêu rõ ngày giờ, hoàn cảnh xảy ra, đánh giá vết thương, mức độ nguy cơ của phơi nhiễm. Lấy chữ ký của những người chứng kiến và chữ ký của người phụ trách.

10.2.3. Đánh giá nguy cơ phơi nhiễm:

- Có nguy cơ:

+ Tồn thương do kim có chứa máu đâm xuyên qua da gây chảy máu: kim nòng rộng cỡ to, chứa nhiều máu, đâm sâu thì nguy cơ cao hơn kim nòng nhỏ, chứa ít máu và đâm xuyên nông.

+ Tồn thương da sâu do dao mổ hoặc các ống nghiệm chứa máu và chất dịch cơ thể của người bệnh bị vỡ đâm phải.

+ Máu và chất dịch cơ thể của người bệnh bắn vào các vùng da, niêm mạc bị tồn thương viêm loét hoặc xây sát từ trước (thậm chí ngay cả khi không biết có bị viêm loét hay không): nếu viêm loét hoặc xây sát rộng thì nguy cơ cao hơn.

Không có nguy cơ: Máu và dịch cơ thể của người bệnh bắn vào vùng da lành.

10.2.4. Xác định tình trạng HIV của nguồn gây phơi nhiễm

- Bệnh nhân đã được **xác định HIV dương tính (+)**: Tìm hiểu các thông tin về tiền sử và đáp ứng đối với thuốc ARV

- Nếu **chưa biết về tình trạng HIV** của nguồn gây phơi nhiễm: Tư vấn và lấy máu xét nghiệm HIV.

- Trường hợp **không thể xác định được** (bị phơi nhiễm trong trường hợp đang làm nhiệm vụ, đối tượng trốn thoát).

10.2.5. Xác định tình trạng HIV của người bị phơi nhiễm

- Tư vấn trước và sau khi xét nghiệm HIV theo quy định.

- Nếu ngay sau khi bị phơi nhiễm, người bị phơi nhiễm có HIV(+): đã bị nhiễm HIV từ trước, không phải do phơi nhiễm.

- Nếu HIV (-): kiểm tra lại sau 3 và 6 tháng.

10.2.6. Tư vấn cho người bị phơi nhiễm:

- Nguy cơ nhiễm HIV, viêm gan B, C.
- Người bị phơi nhiễm cần được cung cấp các thông tin và được tư vấn thích hợp về dự phòng phơi nhiễm, lợi ích và nguy cơ.
- Giới thiệu các tác dụng phụ của thuốc và triệu chứng của nhiễm trùng tiên phát: sốt, phát ban, buồn nôn hoặc nôn, thiếu máu, nổi hạch v.v...
- Tư vấn Phòng lây nhiễm cho người khác: người bị phơi nhiễm có thể làm lây truyền HIV cho người khác dù xét nghiệm HIV âm tính (thời kỳ cửa sổ), vì vậy cần phải thực hiện các biện pháp dự phòng lây nhiễm.
- Tư vấn tuân thủ điều trị và hỗ trợ tâm lý.

Tóm tắt các yếu tố dẫn đến dễ xảy ra tai nạn nghề nghiệp:

- Không tuân thủ nguyên tắc an toàn sinh học chung
- Kỹ thuật, biện pháp xử trí cơ bản còn hạn chế.
- Tâm lý cá nhân bị ức chế, căng thẳng, mệt mỏi, chủ quan.
- Hệ thống quy trình, điều kiện nhân sự vật chất chưa phù hợp.

Biện pháp khắc phục:

- Thực hiện các nguyên tắc về an toàn sinh học chung.
- Thường xuyên nâng cao huấn luyện kiểm tra bổ sung các kỹ thuật và biện pháp xử trí cơ bản.
- Có nhiều kỹ năng hình thức hỗ trợ giải quyết tâm lý cá nhân.
- Xây dựng, xác lập, thực hiện giám sát và điều chỉnh thích ứng hệ thống quy trình chăm sóc điều trị bệnh, xử lý vệ sinh y tế, chất thải độc hại.
- Tổ chức tạo điều kiện nhân sự, vật chất phù hợp nhu cầu công việc.

CÂU HỎI LƯỢNG GIÁ

1/ Để đảm bảo an toàn sức khỏe cho nhân viên

- Nhân viên phải được đào tạo để tuân thủ thực hành an toàn sinh học
- Có chương trình chủng ngừa thích hợp với công việc cho nhân viên phòng thí nghiệm
- Có hộp y tế sơ cứu ở những vị trí quan trọng
- Nhân viên PXN được khuyến khích báo cáo các trường hợp phơi nhiễm tiềm tàng

e. Tất cả đều đúng.

2/ Để xử lý vật liệu nhiễm trùng, câu nào chưa đúng

- a. Có chất khử trùng thích hợp
- b. Bất cứ nhân viên nào cũng có thể thực hiện việc vận chuyển chất nhiễm trùng.
- c. Vật liệu nhiễm trùng thải bỏ được mang đi hàng ngày hoặc thường xuyên hơn một cách an toàn
- d. Tất cả nhân viên phải có kiến thức về qui trình xử lý các vật liệu nhiễm trùng đổ vỡ, tràn.
- e. Có đầy đủ phương tiện để xử lý khi sự cố xảy ra.

3/ Để phòng và chữa cháy trong phòng xét nghiệm, câu nào chưa đúng

- a. Các dung dịch hóa chất dễ cháy phải được dán nhãn và cất giữ trong các bình chứa và các nơi thích hợp
- b. Khu vực dễ cháy phải được cảnh báo rõ ràng
- c. Chỉ những người chịu trách nhiệm về phòng /chữa cháy của đơn vị mới có trách nhiệm và được tập huấn, diễn tập về công tác này.
- d. Hệ thống phát hiện cháy phải đang hoạt động tốt và thường xuyên được kiểm tra.
- e. Các bình chữa cháy di động luôn được nạp đầy, luôn hoạt động tốt và để đúng chỗ theo quy định

4/ Hãy nêu những lợi ích khi hàng năm phải tiến hành đánh giá về an toàn sinh học trong phòng thí nghiệm?

5/ Khoanh tròn số tương ứng với mức độ an toàn sinh học:

5.1 Kỹ thuật vi sinh chuẩn và quần áo bảo hộ, biển báo nguy hiểm sinh học	1	2	3	4
5.2 Tương tự như trên, thêm các quần áo bảo hộ đặc biệt, biện pháp tiếp cận có quản lý, luồng không khí trực tiếp có định hướng	1	2	3	4
5.3 Tương tự như trên, nút không khí lối vào, phun hơi lối ra, thiết bị huỷ rác đặc biệt	1	2	3	4
5.4 Kỹ thuật vi sinh chuẩn	1	2	3	4

6/ Các nguy cơ lây nhiễm nào dưới đây thường xảy ra trong phòng xét nghiệm

- a. Qua đường hô hấp
- b. Qua đường miệng
- c. Qua vết trầy xước
- d. Qua chất nhiễm trùng văng vào mắt
- e. Tất cả các đường lây trên.

7/ Để giảm thiểu tạo khí dung, câu nào dưới đây chưa đúng?

- a. Dùng pi-pét cẩn thận
- b. Rót chất lỏng cẩn thận
- c. Lau chùi nơi đổ tràn ngay bằng chất khử trùng phù hợp
- d. Tránh bọt khí
- e. Dùng ống tube khi pha trộn lắc mẫu

8/ Khi thực hành sử dụng pi-pét, điều nào dưới đây sai?

- a. Không thổi giọt cuối cùng trong pi-pét
- b. Nhỏ chất lỏng càng sát vật chứa càng tốt
- c. Trộn các chất lây nhiễm bằng cách hút thổi lên xuống với pi-pét
- d. Dùng khay nằm ngang để ngâm pi-pét
- e. Tránh thả chất lỏng quá mạnh từ pi-pét

PHỤ LỤC: QUY TRÌNH KỸ THUẬT ĐỐI VỚI CÁC HỆ THỐNG MÁY

I. Quy trình đếm tế bào T-CD4 trên máy FACSCALIBUR

Hệ thống máy FasCalibur bao gồm 1 hoặc 2 đèn laser, các các kênh thu tín hiệu FSC, SSC và 3 hoặc 4 kênh thu tín hiệu huỳnh quang (FL1 – FL4). Trong hệ thống máy này ngoài việc đếm tế bào lympho T-CD4, máy còn có thể thực hiện các ứng dụng khác trong chẩn đoán lâm sàng và trong nghiên cứu.

Hãng BD thiết kế phần mềm chuyên dụng Multiset và bộ sinh phẩm Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP hoặc Multitest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC cùng với ống TruCount có chứa các hạt bi với số lượng xác định phục vụ chuyên biệt cho việc đếm số lượng tuyệt đối tế bào lympho T-CD4. Bên cạnh đó, máy cũng có thể chạy với chế độ tự điều chỉnh với sinh phẩm mở và kết hợp với giá trị công thức máu để thu nhận kết quả về phần trăm, số lượng tuyệt đối tế bào lympho T-CD4. Sau thời gian xử lý mẫu khoảng 45 phút, máy có thể thực hiện đọc kết quả với công suất 50-60 mẫu/giờ.

1. Thiết bị, hoá chất, bệnh phẩm

1.1. Thiết bị

- Máy đếm tế bào dòng chảy Facscalibur
- Pipette 20µl, 50µl, 200µl, 1000µl.
- Máy lắc vortex.
- Tủ lạnh bảo quản sinh phẩm 2-8 độ C.
- Đồng hồ đếm ngược (count down timer).

1.2. Dụng cụ, hóa chất

- Kháng thể đơn dòng:
 - + Tritest CD3-FITC/CD4-PE/CD45-PerCP: dùng đếm số lượng và phần trăm tế bào lympho T-CD4: 340402 – BD
 - + Multitest CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCp/CD45-APC: dùng xác định số lượng và phần trăm tế bào lympho T-CD4 và T-CD8: 340491 - BD
- Chuẩn máy BD Calibrite 3 màu FITC/PE/PerCP 340486 – BD
- Chuẩn máy 4 màu thêm APC 340487 – BD
- Dung dịch ly giải hồng cầu (Facs lysing Solution) 349202 – BD
- Ống TruCount 340334 – BD
- Dịch chạy tạo dòng bao (sheath fluid) 342003 – BD

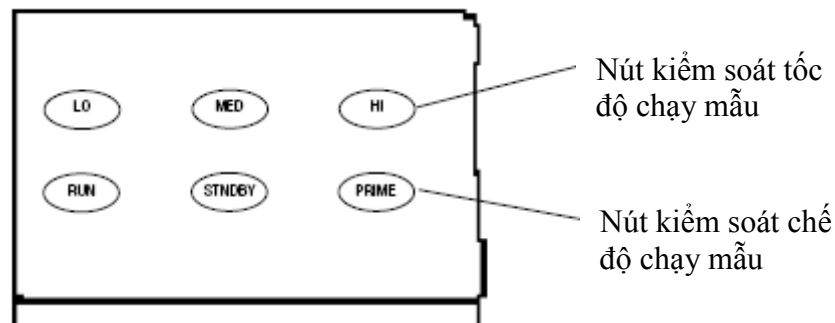
- Dung dịch rửa máy 1 (FacsClean) 340345-BD
- Dung dịch rửa máy 2 (FacsRinse)
- Dung dịch cố định mẫu (fixative) 338036-BD
- Đầu tip 200ul, 1000ul phù hợp với pipet

2. Bệnh phẩm: Theo hướng dẫn về quy định lấy mẫu bệnh phẩm.

3. Kỹ thuật tiến hành

3.1. Vận hành máy

- Khởi động máy: Tiến hành đầu mỗi ngày khi sử dụng máy
- + Thay bình nước thải, cho vào 150ml Javel 5%.
- + Bổ sung dung dịch chạy mẫu (khoảng 2/3 bình).
- + Đóng van áp suất.
- + Bật máy FACSCalibur, trước bật máy tính sau.
- + Đuổi bọt khí “Prime” 3-5 lần, sau đó để máy ở chế độ chờ “Standby”



- Chuẩn máy, chạy mỗi ngày đối với quy trình phân tích tự động:
 - + Chuẩn bị ống A: 1ml sheathfluid + 1 giọt bi không gắn huỳnh quang – unlabeled bead (+ 1 giọt bi có gắn APC nếu là máy 4 màu), lắc đều bằng máy Vortex.
 - + Ống B: 2ml sheathfluid + 1 giọt bi không gắn huỳnh quang + 1 giọt các loại bi có gắn huỳnh quang, lắc đều bằng máy Vortex.
 - + Mở chương trình FascComp
 - + Nhập các thông số lô của hộp Calibrite vào máy
 - + Chọn chế độ Lyse/No wash



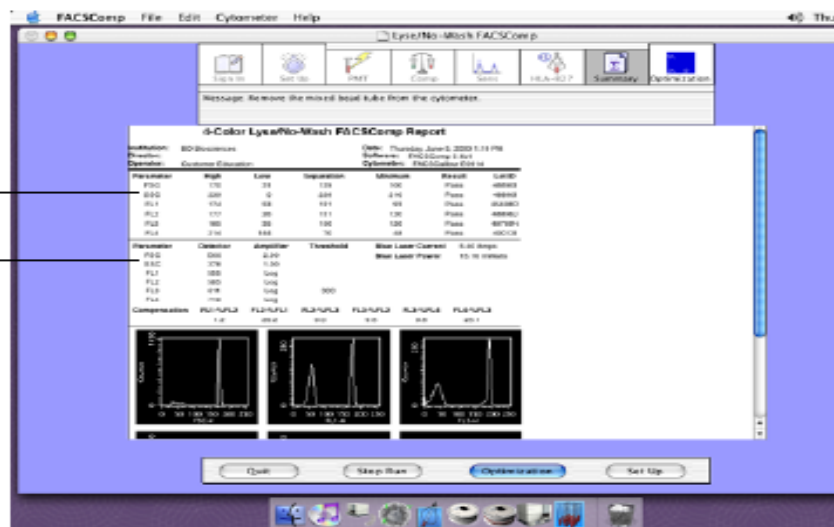
Hình 16. Biểu tượng phần mềm FacsComp trên màn hình máy tính
+ Chạy các ống A và B theo hướng dẫn trên phần mềm.

+ Ghi nhận kết quả, kết quả hiển thị dưới dạng đạt/không đạt (Pass/Fail) nếu tất cả các thông số đều báo đạt cho tiến hành chạy mẫu. Nếu không liên hệ kỹ sư để khắc phục sự cố

+ Tiến hành chuẩn điều kiện chạy mẫu (optimize settings) và lưu kết quả chuẩn, nếu thấy các quần thể phân tích chưa rõ ràng theo phân vùng của kháng thể sử dụng có thể điều chỉnh các thông số trên thanh công cụ cytometer và compensation.

+ Theo dõi tín hiệu PMT và vẽ biểu đồ Leveys Jenning nhằm theo dõi độ ổn định của đèn laser.

+ Khi cân chỉnh máy đạt yêu cầu, tiến hành nhuộm mẫu.



Hình 17. Kết quả chạy chuẩn máy được hiển thị tự động dưới dạng pass/fail (đạt/không đạt) cho tất cả các thông số. Chỉ tiến hành phân tích mẫu khi tất cả các thông số đều đạt

3.2. Phân tích mẫu

- Xử lý mẫu:

- + Ghi mã số của mẫu bệnh phẩm lên ống TruCount
- + Thực hiện mẫu chứng nội (IQC) như một mẫu bệnh phẩm thông thường.
- + Hút vào mỗi ống mẫu 20ul kháng thể (Multitest/Tritest) cho vào mỗi ống mẫu.

+ Cho vào mỗi ống tương ứng 50ul mẫu máu, đậy nắp, lắc vortex nhẹ.

+ Ủ trong tối 15 phút ở nhiệt độ phòng.

+ Cho 450 μ l dung dịch ly giải hồng cầu.

+ Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng.

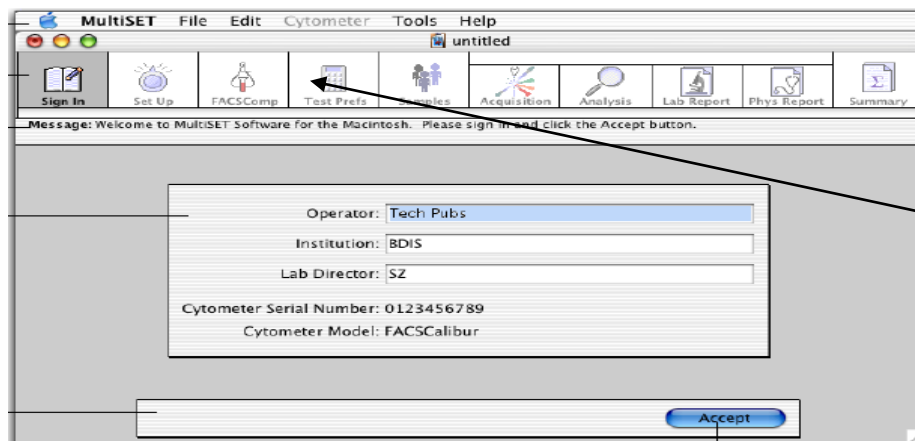
+ Phân tích mẫu bằng máy FacsCalibur bằng phần mềm MULTISSET.

- Chạy mẫu:

+ Mở chương trình chạy mẫu “MULTISSET” trong thư mục BD Application hoặc nhấn vào biểu tượng trên màn hình máy tính.



Hình 18. Biểu tượng phần mềm MULTISSET trên máy tính

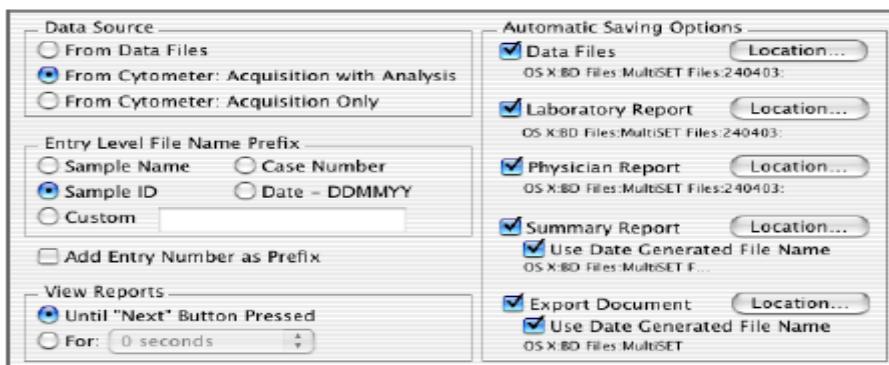


Hình 19. Giao diện phần mềm Multiset

+ Nhập các thông số kỹ thuật trong mục Test Prefs, bao gồm các thông số loại sinh phẩm được sử dụng, lô hóa chất, số lượng hạt beads trên ống TruCount.

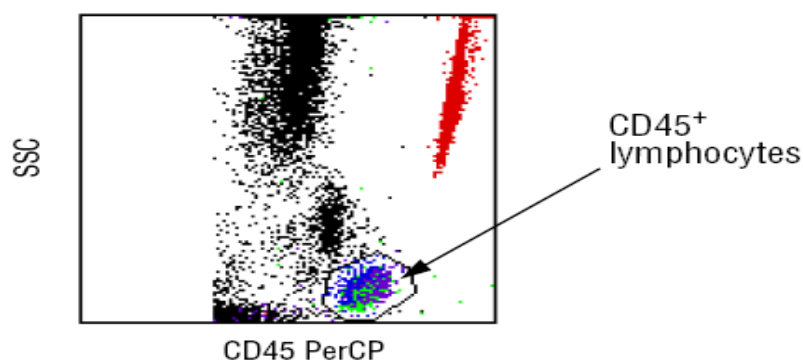
+ Chọn chế độ thu thập thông tin

+ Nhập chế độ báo cáo và lưu giữ thông tin:

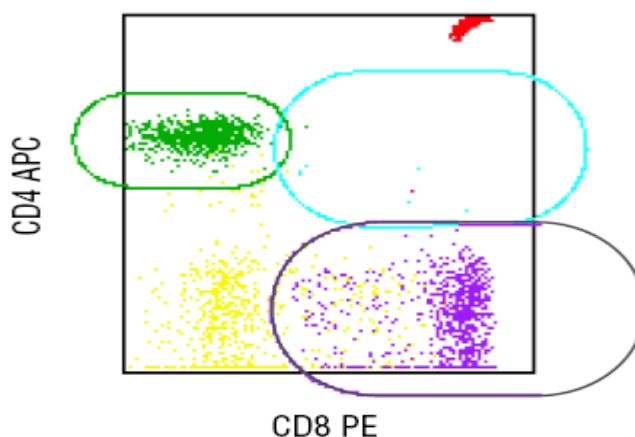


Hình 20. Chế độ báo cáo mẫu phân tích, chế độ lưu giữ thông tin cũng được thiết lập và cho phép người sử dụng chọn đường dẫn

- + Sau khi chọn xong các chế độ nhấn accept và tiến hành chạy mẫu.
- + Đưa mẫu nội kiểm vào vị trí đặt mẫu nhập tên mẫu và nhấn “run tests” để chạy mẫu IQC
- + Đánh giá kết quả mẫu nội kiểm theo hướng dẫn của **quy trình kiểm soát chất lượng**, nếu đạt cho tiến hành chạy mẫu. Nếu không đạt tìm nguyên nhân và biện pháp khắc phục.
- + Nhập mã số mẫu kế tiếp cho mẫu vào và tiếp tục nhấn “Run tests”:



Hình 21. Hiện thị khoanh vùng tự động lympho bào trong quá trình thu thập dữ liệu.



Hình 22. Khoanh vùng tế bào lympho T-CD4 và T-CD8. Vùng màu xanh lá cây là vùng quần thể lympho T CD4, vùng màu tím là vùng lympho T CD8

+ Sau mỗi lần chạy, kết quả sẽ được tự động phân tích và in. Kiểm tra kết quả nếu có bất thường phải xử lý ngay (theo hướng dẫn lỗi phát sinh của BD).

- Rửa máy và tắt máy:

+ Cho ống dung dịch rửa máy 1 - “FacsClean” vào, chạy 5 phút (chế độ high).

+ Cho ống dung dịch rửa máy 2 - “FacsRinse” vào, chạy 5 phút (chế độ high).

+ Thay bằng ống nước cất, chạy 5 phút và giữ nguyên trên máy.

+ Chuyển sang chế độ standby.

+ Mở van áp lực và tắt máy.

4. Sự cố và cách khắc phục

Mẫu chạy quá nhanh: thông thường khi mẫu có hồng cầu non, không bị ly giải mẫu thường đọc rất nhanh (khoảng 3-5s). Khắc phục sự cố bằng cách chuyển sang chế độ đọc theo thời gian. Vào mục Test Prefs trên góc màn hình chọn chuyển chế độ. Hoặc có thể để mẫu ở nhiệt độ phòng sau 24h rồi xử lý mẫu lại.

Mất áp lực khi chạy mẫu: thông thường ống tuýp bị nứt vỡ hoặc công hút mẫu bị hở sẽ làm mất áp lực, mẫu sẽ không được hút lên, có hiện tượng trào dung dịch sheathfluid vào ống mẫu. Đèn chạy mẫu “Run” chuyển từ màu xanh lá cây sang vàng. Khắc phục sự cố bằng cách kiểm tra lại ống mẫu xem có nứt mẫu hay không. Xử lý lại mẫu khi ống mẫu bị nứt vỡ. Nếu lỗi do công hút mẫu cần phải liên lạc với kỹ sư của hãng.

Số lượng bi chuẩn không được đếm đủ: (Could not acquire the BDIS-reference 500 bead events). Khắc phục sự cố: xem lại vị trí khoanh vùng hạt bi chuẩn, tăng ngưỡng (threshold) trong trường hợp có nhiều tín hiệu nhiễu.

Không thể khoanh vùng quần thể lympho: quần thể lympho và mono lẫn vào nhau và không thể khoanh vùng do tính toàn vẹn mẫu không đảm bảo. Khắc phục: mở rộng hình ảnh phân tích tiến hành lấy công bằng tay hoặc nếu thấy có hiện tượng quần thể CD3 âm và dương tính không thể phân tách thì cho lấy mẫu lại.

Vị trí các quần thể không nằm trong khoanh vùng mặc định: một số trường hợp tế bào có bất thường về biểu hiện các kháng nguyên bề mặt làm cho các tín hiệu huỳnh quang thu nhận từ các kháng nguyên tương ứng bị lệch ra khỏi khoanh vùng mặc định của máy. Thường gặp khi chạy mẫu máu trẻ em, mẫu máu đã cố định, bệnh nhân dùng thuốc kháng ARV ... Ví dụ: đám quần thể âm tính tràn sang vùng dương tính CD4 (CD8), hoặc khi chạy mẫu kiểm tra chất lượng vùng lympho

bào nằm ngoài vùng mặc định. Khắc phục bằng cách chỉnh tay khoan vùng tự động, hoặc vào mục optimize settings để chuẩn và chạy lại mẫu.

Những lỗi về máy có thể tham khảo tài liệu của nhà sản xuất được cung cấp theo máy.

II. Quy trình đếm tế bào T-CD4 trên máy CYFLOW SL3

Hệ thống máy Cyflow Partec dùng trong xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4 bao gồm hai dòng máy là Cyflow Couter và Cyflow SL 3. Cả hai dòng máy đều có 1 đèn laser, có khả năng khảo sát 3 chỉ tiêu bao gồm SSC và hai màu huỳnh quang, có thể cung cấp các kết quả về cả phần trăm hoặc số lượng tuyệt đối tế bào lympho T-CD4 tùy vào bộ sinh phẩm sử dụng (CD4-PE hoặc CD45 PE Dy647/CD4 PE). Hệ thống máy Cyflow xác định số lượng tuyệt đối của quần thể tế bào phân tích dựa trên việc đo lường thể tích thực (200ul) giữa hai đầu điện cực khi hút mẫu. Đây là hệ thống đóng, có thiết kế đơn giản, gọn nhẹ và giá thành xét nghiệm tương đối thấp. Sau thời gian xử lý mẫu khoảng 30 phút, máy có công suất 15-20 mẫu/giờ.



1. Dụng cụ, hoá chất, bệnh phẩm

1.1. Dụng cụ và thiết bị:

- Máy đếm tế bào CD4 Cyflow SL3.
- Phòng làm việc kín, không có bụi, nhiệt độ 18 – 25⁰C.
- Các thiết bị phụ trợ gồm:
 - + Tủ lạnh để bảo quản hóa chất.
 - + Hộp kín để ủ mẫu.
 - + Ống chạy mẫu chuyên dụng 3.5ml
 - + Pipette (10µl, 20µl, 1000µl).
 - +Đầu côn.
 - + Đồng hồ bấm giây.

1.2. Hóa chất và sinh phẩm

- Kit CD4 mAB-PE, CD45 mAB PE-Dy 467.
- Nước cất 2 lần***.

- Hóa chất pha dung dịch nước Sheath gồm 2 lọ: Twin và sodium azide
- Mẫu chuẩn máy (Countcheck beads green).
- Dung dịch rửa máy (CLEANING SOLUTION – màu xanh).
- Dung dịch khử trùng (DECONTAMINATION SOLUTION-màu tím).

1.3. Bệnh phẩm

Theo hướng dẫn về quy định lấy mẫu bệnh phẩm.

2. Kỹ thuật tiến hành

2.1. Vận hành máy

* Bước 1: Kiểm tra hệ thống trước khi chạy

Đảm bảo các cáp nối, dây điện đã nối đúng; bình chứa dung dịch tạo dòng (sheath fluid) đầy ở mức 800ml (Cách pha dung dịch tạo dòng: đổ đầy nước cất 2 lần vào bình chứa tam giác bỏ sung thêm vào bình chứa 1 lọ twin và 1 lọ sodium azide lắc đều và phải chuẩn bị trước 24h, hạn sử dụng là 1 tháng); bình chứa nước thải cạn (cho 25ml hypochloride vào vào bình thải); các nắp chai được đóng chặt; các ống dẫn không có bọt (ống dẫn dung dịch tạo dòng).

- Bật máy CyFlow SL3 bằng công tắc phía sau lưng máy.
- Bật máy in.
- Bật máy tính sau 5-10p.
- Khởi động chương trình FloMax bằng cách kích đúp vào biểu tượng FloMax trên màn hình. Chọn chính xác nút Ok để mở màn hình làm việc.

* Bước 2: Rửa máy trước khi thực hiện chạy

- Lấy 1,6ml dung dịch rửa máy (CLEANING SOLUTION – màu xanh) vào ống nghiệm, cắm ống vào cổng lấy hút mẫu, làm dứt khoát cho đến khi nghe tiếng click phát ra. Máy sẽ tự động chạy để rửa. Để máy chạy hết 1,6ml dung dịch. Sử dụng tốc độ 4 để rửa máy.

- Tiến hành rửa lại bằng dung dịch nước Sheath như sau: Trên thanh công cụ kích vào **Acquisition/sheath fluid prime**, dung dịch Sheath sẽ được tự động bơm ngược từ bình đựng nước sheath ra ống mẫu. Theo dõi mức nước chảy vào ống mẫu, bấm **OK** để kết thúc. Tiến hành rửa bằng dung dịch sheath ít nhất là 1,6ml.

* Bước 3: Kiểm tra máy bằng mẫu chuẩn máy-count check beads green

- Chuẩn bị hoá chất chuẩn:

+ Lấy hoá chất chuẩn được bảo quản trong tủ lạnh 2- 8 °C, đưa về nhiệt độ phòng 20-25°C trong 15-20p.

- + Trộn đều bằng tay, không vortex để tránh vỡ các hạt chuẩn.
- + Sử dụng pipet hút 850µl dung dịch hoá chất chuẩn vào ống đựng mẫu.

- Tạo form đồ thị và thông số chuẩn:

+ Lấy biểu đồ chuẩn: Vào mục **File/ Open/ System C/ Flomax/ count check chuẩn**. Mở file count check chuẩn bằng động tác kích đúp => Thu được biểu đồ chuẩn cho chạy hoá chất chuẩn máy.

+ Lấy thông số chuẩn: Kích vào nút **Load** ở góc trái phía dưới màn hình và theo đường dẫn sau: **File/ Open/ System C/ Flomax/ Count check chuẩn. ist**. Kích đúp để mở file và chọn open => Thu được thông số chuẩn cho chạy count check beads green.

- Chạy count check:

+ Lắc đều ống mẫu, sau đó cắm ống vào cổng hút mẫu cho đến khi nghe có tiếng “tách” phát ra.

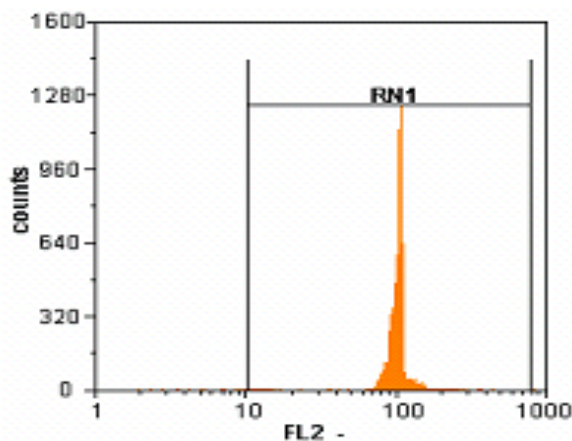
+ Để cho máy tự động chạy, khi đó đèn RUN trên thân máy CyFlow SL3 sẽ sáng.

+ Khi máy chuyển sang chế độ đếm, đèn COUNT sáng thì không được tác động gì vào máy.

- Phân tích kết quả:

+ Tạo cổng gating để thu kết quả theo đường dẫn sau: trên màn hình hiển thị vào mục **Analysis/ Gating**, chọn **Delete** hoặc **clear all** để xoá cổng cũ. Lấy cổng mới bằng cách chọn **range/** nhấn nút **new** để tạo cổng.

+ So sánh kết quả của vùng tạo cổng với số đếm trên thân lọ count check beads green với dung sai cho phép là +/- 10%. Nếu kết quả nằm trong giới hạn cho phép, và phù hợp với biểu đồ Levey-jenning khi đó chúng ta tiến hành xử lý và chạy mẫu bệnh phẩm.



Hình 23. Hình dạng tiêu chuẩn của đồ thị đếm CountCheck

Chú ý: Tiến hành rửa máy theo qui trình đã được đề cập ở trên trước khi chuyển sang ứng dụng mới như CD4, CD3, CD8 hoặc CD4%.

2.2. Phân tích tuyệt đối

*** Chuẩn bị mẫu**

- Trộn đều ống máu
- Lấy 20µl máu toàn phần cho vào ống đựng mẫu chuyên dụng. (tráng đầu côn 1-2 lần trước khi hút mẫu và có thể sử dụng pipet ngược để hạn chế mất tế bào).
- Bổ sung 20µl dung dịch sinh phẩm CD4 mAB-PE vào, trộn đều (bằng cách lắc ống nghiệm, không sử dụng máy vortex) sau đó ủ trong bóng tối 15 phút ở nhiệt độ phòng.
- Bổ sung 800µl dung dịch đệm Buffer 1, trộn đều (không trộn bằng máy vortex sợ làm đứt liên kết kháng thể gắn trên tế bào). Mẫu máu đã sẵn sàng để được phân tích.
- Mẫu máu sau khi nhuộm và bổ sung dung dịch đệm (buffer) có thể phân tích trong vòng 6 giờ trong điều kiện nhiệt độ phòng hoặc 48h nếu được bảo quản ở nhiệt độ 2- 8 °C.

*** Thiết lập máy cho chạy mẫu CD4 tuyệt đối**

- Thiết lập biểu đồ chuẩn theo đường dẫn sau: Vào mục **File/open/ system C/ Flomax/ CD4 chuẩn**. Kích đúp và chọn open ta thu được biểu đồ chuẩn.
- Thiết lập thông số chuẩn: Trên panel góc trái của màn hình chọn **Load** và theo đường dẫn sau: **File / Open/ System C/ Flomax/ CD4 chuẩn.ist**. Kích đúp ta thu được thông số chuẩn.

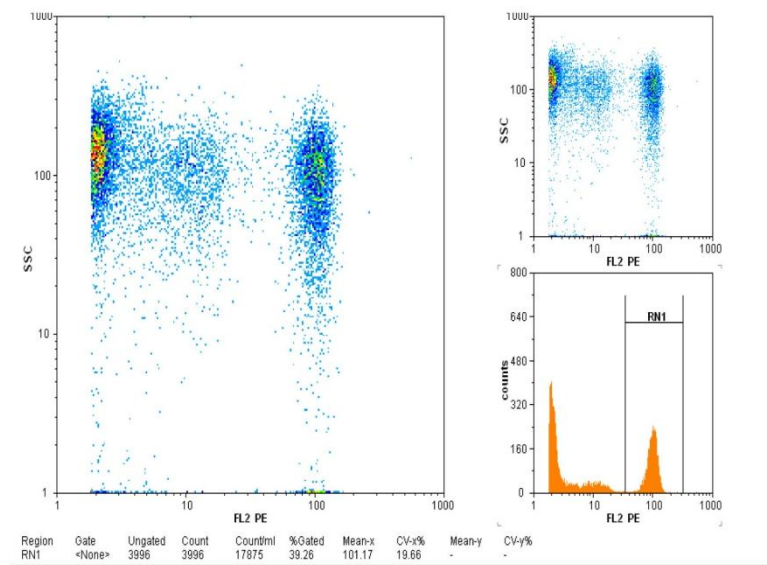
*** Đếm tế bào CD 4 tuyệt đối**

Lắc đều ống mẫu trước khi phân tích, đưa ống nghiệm vào cổng hút mẫu, để máy tự động làm việc, .Khi máy chuyển sang chế độ COUNT thì không tác động gì thêm để máy chạy đến khi kết thúc. Chờ máy tự động rửa xong, tháo ống nghiệm, tiến hành lưu file dữ liệu và tiến hành phân tích.

*** Phân tích kết quả**

- Khoanh vùng quần thể tế bào:
- + Vào mục **Analysis => Gating** để lấy mục gating
- + Chọn loại **Range**
- + Nhấn nút **New** để tạo cổng.

+ Đưa chuột đến biểu đồ FL2 (phía dưới bên phải màn hình) đặt giới hạn dưới phía bên trái của đỉnh đồ thị và đặt giới hạn trên phía bên phải đỉnh đồ thị, có thể chỉnh để phần đồ thị nằm trong vùng gating.

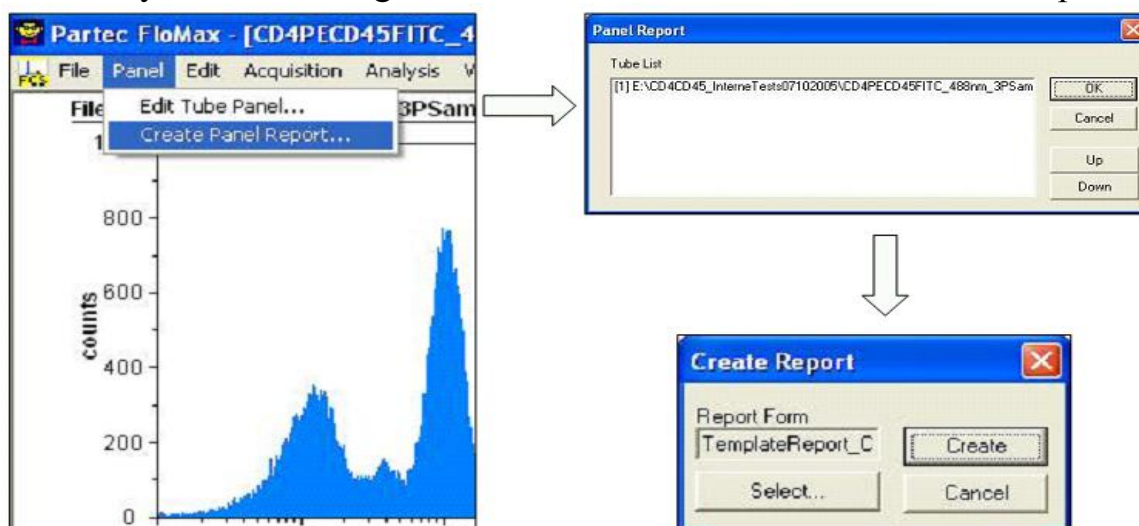


- Tạo báo cáo:

+ Vào mục **Panel** => **Creat report**: cửa sổ nhỏ xuất hiện, nhấn nút **Select** để chọn template báo cáo cho CD4 theo đường dẫn sau: **System C/ Flomax/ Report/ sample/ HIV monitoring/ CD4 template** (dạng file word).doc. Sau đó nhấn nút **Creat**.

+ Báo cáo sẽ tự động được xuất ra dạng file Word (.doc)

Chú ý: Tắt các đường dẫn của các dữ liệu thô khác nhau khi tạo report.



Hình 24. Các bước tạo báo cáo với file dữ liệu đang được mở

- In kết quả: Trên màn hình chương trình Microsoft Word, nhấn biểu tượng máy in hoặc vào mục **File** => **print** để in báo cáo.

*** Khử trùng máy sau khi thực hiện xét nghiệm**

- Lấy 1,6ml dung dịch khử trùng (DECONTAMINATION SOLUTION) màu tím vào ống nghiệm rồi cắm vào cổng hút mẫu. Để máy chạy khoảng 5 giây thì nhấn nút **STOP** để dừng máy trong vòng 10 phút (vẫn để nguyên ống dung dịch gắn vào cổng hút mẫu), sau đó nhấn nút **START** để máy chạy tự động cho đến khi kết thúc. Chạy máy với dung dịch nước SHEATH trong 2 phút rồi nhấn **STOP**- bước rửa này là bắt buộc để tránh đóng cặn trong cuvet.

- Thoát khỏi chương trình FloMax, tắt máy tính, máy in và cuối cùng tắt máy CyFlow SL3.

2.3. Phân tích CD4%

*** Chuẩn bị mẫu**

- Lấy 20µl máu toàn phần cho vào ống nghiệm.

- Bổ sung 10µl dung dịch sinh phẩm CD4 mAB-PE và 10µl sinh phẩm CD45 mAB PE-Dy 467, trộn đều sau đó ủ trong tối 15 phút.

- Bổ sung 400µl dung dịch đệm Buffer 1. Ngay trước khi phân tích, bổ sung thêm 400µl dung dịch đệm buffer 2 (bằng cách lắc ống nghiệm, không sử dụng máy vortex), trộn đều. Mẫu máu đã sẵn sàng để được phân tích.

(Mẫu máu sau khi bổ sung buffer 1 có thể sử dụng trong vòng 2 ngày trong điều kiện nhiệt độ 2-8⁰C).

*** Thiết lập máy**

- Thiết lập biểu đồ chuẩn theo đường dẫn sau: Vào mục **File/open/ system C/ Flomax/ CD4% chuẩn**. Kích đúp và chọn open ta thu được biểu đồ chuẩn.

- Thiết lập thông số chuẩn: Trên panel góc trái của màn hình chọn Load và theo đường dẫn sau: **File / Open/ System C/ Flomax/ CD4% chuẩn**. Kích đúp ta thu được thông số chuẩn.

*** Phân tích CD4%**

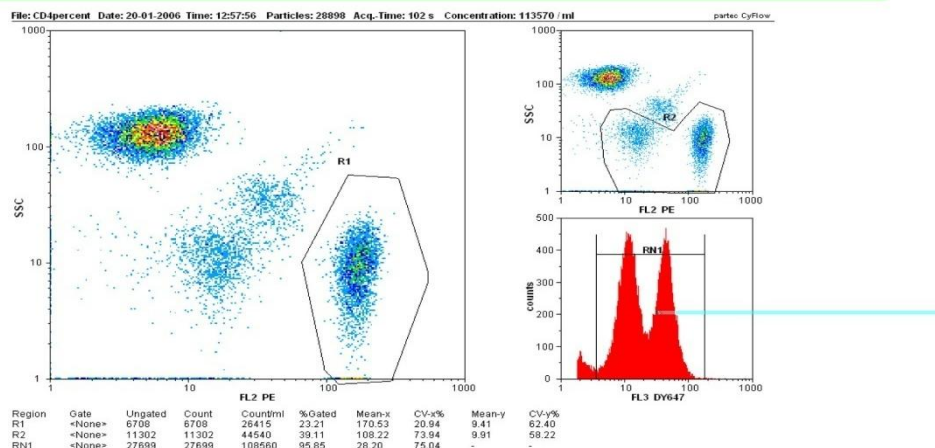
- Lắc đều ống mẫu trước khi phân tích, đưa ống nghiệm vào cổng hút mẫu, để máy tự động làm việc, có thể nhấn nút **CLEAR** để làm mới màn hình khi đỉnh biểu đồ lên cao.

- Khi máy chuyển sang chế độ COUNT thì không tác động gì thêm để máy chạy đến khi kết thúc. Chờ máy tự động rửa xong, tháo ống nghiệm, tiến hành lưu file dữ liệu và tiến hành phân tích

*** Phân tích kết quả**

- Chọn GATE:

- + Vào mục **Analysis** => **Gating** để lấy mục gating.
- + Chọn loại **Polygon**.
- + Nhấn nút **New** để tạo cổng.
- + Đưa chuột đến biểu đồ FL2 SSC (phía dưới bên trái màn hình) chọn và đặt giới hạn trên phía bên phải đỉnh đùng R1 trên biểu đồ (vùng tế bào CD4), rê chuột sang biểu đồ FL2 SSC để chọn vùng R2 (vùng tế bào CD4 và CD45).



Cell Population	Comment	Concentration (diluted blood sample)	Concentration (Whole blood sample)
CD4 ⁺ T-cells	Polygon R1	26,415 cells/ml	1109 cells/μl
Lymphocytes	Polygon R2	44,540 cells/ml	1871 cells/μl
Leukocytes	Range RN1	108,560 cells/ml	4560 cells/μl
CD4⁺ % T-cell count	R1/R2	59.3%	59.3%

Hình 25. Biểu đồ kết quả đếm tế bào CD4%

- Tạo báo cáo:
 - + Vào mục **Panel** => **Create report**: cửa sổ nhỏ xuất hiện, nhấn nút **Select** để chọn template báo cáo cho CD4% theo đường dẫn sau: **System C/ Flomax/ Report/ sample/ HIV monitoring/ CD4% template** (dạng file word).doc. Sau đó nhấn nút **Create**.
 - + Báo cáo sẽ tự động được xuất ra dạng file Word (.doc)
- Chú ý: tắt các bản kết quả khác khi tạo report
- In kết quả: Trên màn hình chương trình Microsoft Word, nhấn biểu tượng máy in hoặc vào mục **File** => **print** để in báo cáo.
- * **Khử trùng máy**
 - Lấy 1,6ml dung dịch khử trùng (DECONTAMINATION SOLUTION) màu tím vào ống nghiệm rồi cắm vào cổng hút mẫu.
 - Để máy chạy khoảng 5 giây thì nhấn nút **STOP** để dừng máy trong vòng 10 phút (vẫn để nguyên ống dung dịch gắn vào cổng hút mẫu), sau đó nhấn nút **START** để máy chạy tự động cho đến khi kết thúc.

- Chạy máy với dung dịch nước SHEATH trong 2 phút rồi nhấn STOP- bước rửa này là bắt buộc để tránh đóng cặn trong cuvet.

3. Một số lỗi thường gặp trên máy CYFLOW SL3 và cách xử lý

Người sử dụng cần nắm chắc nguyên lý hoạt động của máy để có thể xác định nguyên nhân của sự cố một cách nhanh chóng và chính xác.

Khi có sự cố thì cần tiến hành xác định sự cố và xử lý theo nguyên tắc từ đơn giản đến phức tạp.

TT	Hiện tượng	Nguyên nhân	Xử lý
1	Bật máy không thấy đèn phía trước sáng	Chưa vào điện do dây dẫn bị tuột.	Kiểm tra dây dẫn và cắm lại cho chắc.
		Bộ đổi điện bị hỏng	Yêu cầu thay bộ đổi điện mới
		Bộ phận điện tử trong máy bị hỏng	Yêu cầu hãng cung cấp sửa chữa
2	Khởi động phần mềm FloMax, khi biểu đồ hiện ra thì thấy có báo trên trục đồ thị ở các biểu đồ là “No Selection”	Do khi khởi động phần mềm đã bấm nhầm nút Cancel trên cửa sổ nhỏ hiện ra sau khi bấm vào biểu tượng FloMax thay vì phải bấm nút OK	Nạp lại các thông số tương ứng cần sử dụng. Thoát khỏi phần mềm rồi vào lại phần mềm.
3	Bật phần mềm thấy máy báo bình waste đã đầy trong khi mức dung dịch trong bình chưa chạm đến điện cực đo mức dung dịch.	Do hơi ẩm đã bám vào nắp bình, gây ra hiện tượng nổi cực giữa hai điện cực báo mức dung dịch.	Mở nắp bình chứa nước thải, dùng giấy thấm khô lau sạch các góc điện cực và phần nắp xung quanh, có thể dùng máy sấy để làm khô
4	Khi cắm ống mẫu vào cổng hút mẫu, thấy dung dịch trong ống bị dâng lên	Cắm ống mẫu chưa đúng, có hở khí giữa cổng hút mẫu và ống nghiệm chứa mẫu	Thay mẫu khác, chú ý luyện tay để thao tác chính xác hơn.
		Ống nghiệm bị vỡ. nứt gây ra hở khí	Kiểm tra và thay ống mẫu khác không bị vỡ
		Doãng kín khí bên trong cổng hút mẫu bị rách, xước do sử dụng quá lâu chưa thay	Thay doãng mới

TT	Hiện tượng	Nguyên nhân	Xử lý
		Đường ống dẫn từ bơm mẫu đến cổng hút mẫu bị hỏng làm dung dịch sheath có áp suất cao hơn đi vào ống mẫu	Thay định kỳ hệ thống ống dẫn dây
5	Cắm ống mẫu vào không thấy máy hút mẫu (nhìn bình chứa thải không có nước chảy vào)	Nắp đậy bình chứa dung dịch sheath không được đậy kín	Đậy lại nắp bình cho kín
		Van điều tiết bị hỏng	Yêu cầu thay mới
		Bơm nén khí bị hỏng	Yêu cầu thay mới
		Đường ống dẫn trong máy bị tắc	Thay mới
		Cổng hút mẫu bị hỏng (đứt dây dẫn của điện cực)	Yêu cầu thay mới cổng hút mẫu.
6	Máy hút mẫu nhưng không thấy tín hiệu trên màn hình	Giá trị của các thông số máy (Gain, L-L, U-L,...) chỉnh chưa đúng	Chỉnh lại các giá trị đó cho đảm bảo
		Ống dẫn mẫu từ cổng hút mẫu đến cuvette bị đứt	Thay đường ống định kỳ để tránh bị trục trặc
		Cuvette bị lệch (sau khi chỉnh các thông số máy không có kết quả)	Căn chỉnh lại vị trí cuvette
		Bộ nguồn laser bị hỏng (mở máy không thấy có tia laser)	Thay mới bộ nguồn laser
		Bộ cảm biến tín hiệu bị hỏng	Thay thế bằng bộ cảm biến mới
		Hỏng hóc các bộ phận điện tử khác	Yêu cầu kỹ sư của hãng kiểm tra.
7	Tín hiệu chạy CountCheck không tập trung (không nằm đúng vị trí đã được thiết lập, chân loe rộng)	Nhiệt độ làm việc quá cao	Kiểm tra nhiệt độ làm việc của máy, điều chỉnh về cho đúng
		Bình nước sheath bị nhiễm bẩn	Thay mới dung dịch sheath sau khi đã vệ sinh bình thật kỹ

TT	Hiện tượng	Nguyên nhân	Xử lý
		Trong đường ống có bột	Thực hiện thao tác ngâm rửa máy để đuổi bột
		Bình sheath bị hở khí	Kiểm tra, vặn chặt nắp bình
		Cuvette tạo dòng chảy bị rạn vỡ	Thay mới cuvette
8	Tín hiệu chạy CountCheck đạt về hình dạng, vị trí nhưng số lượng hạt đếm được không phù hợp với số ghi trên nhãn chai	Thao tác lắp lọ chứa CountCheck chưa đúng nên mẫu chưa mang tín đại diện	Cần luyện tay để không bị mắc lỗi này
		Dung dịch countcheck đã bị hỏng (do bảo quản, do sử dụng sai cách kéo dài làm thay đổi nồng độ hạt chuẩn	Thay lọ countcheck mới
		Điện cực trong cổng hút mẫu bị cong nên không đảm bảo thể tích kiểm tra là 200µl	Căn chỉnh lại điện cực ở cổng hút mẫu
9	Tín hiệu xuất hiện tốt nhưng không có kết quả đếm CountCheck	Điện cực trong cổng hút mẫu bị bẩn, dính ướt nên dẫn đến hiện tượng nổi cực	Vệ sinh điện cực, lau khô
10	Khi cắm ống nghiệm vào cổng hút mẫu nhưng máy không tự động bắt đầu hút mẫu	Điện cực của cổng hút mẫu bị bẩn	Vệ sinh theo quy trình vệ sinh máy.
		Dây nối của điện cực bị tuột	Kiểm tra lại dây dẫn, đầu nối của các điện cực.
11	Nguồn sáng và vị trí cuvette đã được chỉnh tốt nhưng tín hiệu xuất hiện vẫn không phân tách được tốt giữa của mẫu và nhiễu nền	Mẫu phân tích bị nhiễm bẩn	Kiểm tra lại máy bằng mẫu khác
		Dung dịch sheath bị bẩn	Thay dung dịch mới
		Miếng lọc lắp trong ống dẫn dung dịch sheath bị tắc do bẩn	Thay mới miếng lọc trong đường ống dẫn dung dịch sheath
12	Có nhiều tín hiệu nhỏ xuất hiện bên trái đồ thị	Bình chứa dung dịch sheath đã bị cạn	Đổ mới dung dịch sheath vào chai
		Có bột nằm trong cuvette	Tiến hành rửa máy để đẩy bột khí ra khỏi cuvette

4. Một số thuật ngữ dùng trong kỹ thuật phân tích tế bào trong dòng chảy

Dot plot: Loại biểu đồ biểu diễn giá trị của 2 thông số. Biểu đồ này có hai trục, mỗi trục sẽ đại diện cho một tín hiệu cần quan tâm. Vị trí mỗi tín hiệu được quyết định bởi cặp giá trị hai tín hiệu của tế bào đó.

Event: Là sự kiện có một hạt – hoặc một tế bào đi ngang qua tia sáng được hệ thống thu nhận tín hiệu phát hiện.

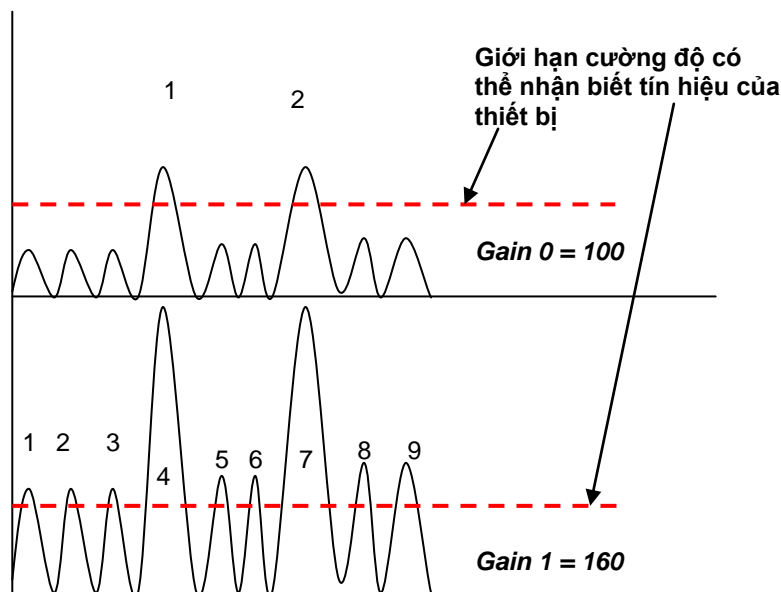
Filter: Bộ lọc tín hiệu quang học, có bản chất là loại kính lọc sáng, cho phép chọn lọc dải bước sóng điện từ đi qua nó. Trong máy phân tích tế bào, nó được sử dụng để tách tín hiệu đặc hiệu và để chuyển hướng tia sáng tín hiệu

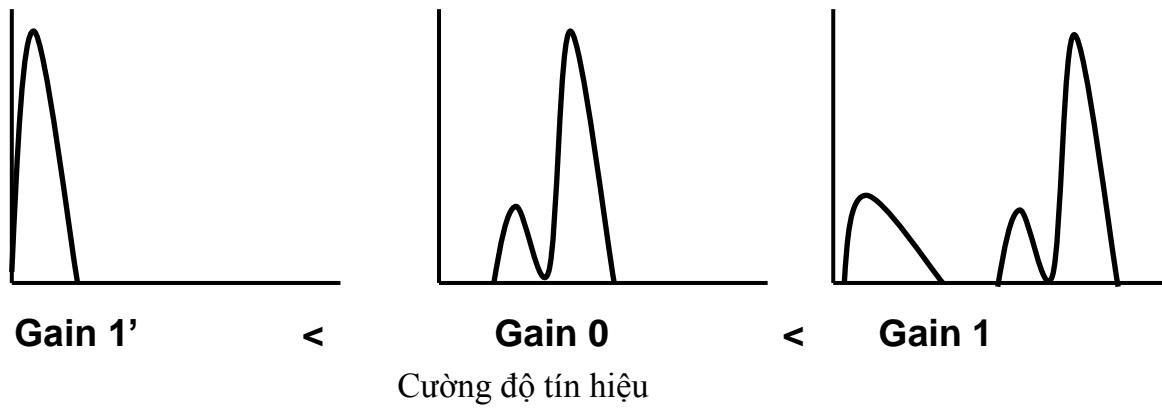
FL: Kênh tín hiệu huỳnh quang. Được sử dụng để đại diện cho một cảm biến tín hiệu huỳnh quang (FL1- FL2 – FL3,...) nó chỉ có tính định danh, không có giá trị xác định. Nó hoàn toàn được xác định một cách chủ quan bởi nhà sản xuất.

FSC: Tín hiệu tán xạ theo hướng tia tới, đặc trưng cho kích thước của tế bào.

Gain: Tín hiệu phản xạ của tế bào (hạt) rất nhỏ trong khi độ nhạy của thiết bị nhận biết có giới hạn -> muốn thiết bị nhận biết được tín hiệu thì cần sử dụng bộ phận khuếch đại tín hiệu để khuếch đại nó lên trên mức giới hạn nhận biết của máy. **Gain** chính là chỉ số đặc trưng cho mức độ khuếch đại tín hiệu được thiết lập cho thiết bị khuếch đại tín hiệu của máy. Gain càng cao thì càng có nhiều tín hiệu xuất hiện

Cường độ tín hiệu





Gate: là khoảng giới hạn giúp phân biệt quần thể tín hiệu quan tâm khỏi các quần thể tín hiệu khác.

Lin. Là toán tử biểu diễn cường độ tín hiệu tuyến tính, nó ít được sử dụng vì khó biểu diễn phổ tín hiệu có các cụm tín hiệu sai khác nhau nhiều

Log. Là toán tử biểu diễn tín hiệu dạng logarithm, nó được sử dụng vì có khả năng kéo giãn các khoảng giá trị cường độ tín hiệu bị chồng lên nhau đồng thời có khả năng rút ngắn khoảng cách tín hiệu khác nhau.

L-L: Là ngưỡng cắt bỏ các tín hiệu có giá trị nhỏ hơn giá trị quan tâm.

Parameter: Là thông số cần thu thập của mẫu phân tích (do người thao tác quyết định)

Resolution: Độ phân giải tín hiệu, là mức độ chia nhỏ các khoảng tín hiệu được hiển thị trên biểu đồ biểu diễn tín hiệu. Độ phân giải càng cao, các khoảng giá trị được chia càng nhỏ.

Trigger: Là thông số chính, trong kỹ thuật phân tích tế bào trong dòng chảy. Nó cho phép xác định tín hiệu ưu tiên, khi tế bào đi qua điểm phân tích, chỉ có tế bào nào có loại tín hiệu ưu tiên thì sẽ được thu nhận tín hiệu tiếp theo còn những tế bào nào không có tín hiệu ưu tiên thì sẽ không được thu nhận các tín hiệu khác nữa.

SSC: Tín hiệu tán xạ góc bên, đặc trưng cho hình dạng, cấu trúc hạt của tế bào.

U-L: Là ngưỡng cắt bỏ tín hiệu có cường độ tín hiệu lớn hơn mức tín hiệu quan tâm.

III. Quy trình đếm tế bào T-CD4 trên máy FACSCOUNT

Dòng máy FacsCount có 1 đèn laser và đọc được 2 màu huỳnh quang và SSC, được thiết kế để dùng cho việc đếm tế bào lympho T-CD4.

Hệ thống máy FacsCount là hệ thống đóng sử dụng bộ sinh phẩm chuyên biệt để phát hiện số lượng tuyệt đối tế bào T-CD4, T-CD8 hoặc phát hiện đồng thời cả số lượng tuyệt đối và giá trị phần trăm tế bào lympho T-CD4 bằng sinh phẩm CD4% trong máu toàn phần. Sau thời gian xử lý mẫu khoảng 60 phút, máy có công suất 10-15 mẫu/giờ.

1. Thiết bị và sinh phẩm

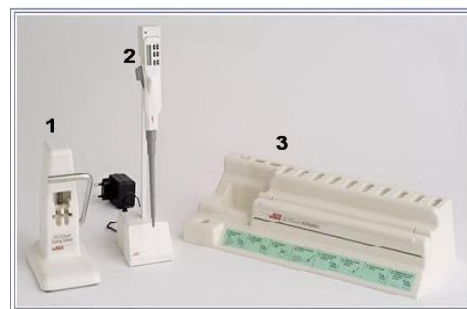
1.1. Thiết bị

- Máy FacsCount của Becton Dickinson;

1. Bàn phím
2. Giá đưa mẫu
3. Nơi chứa chất lỏng
4. Ổ đĩa mềm
5. Máy in nhiệt



- Máy mở nắp sinh phẩm CORING STATION (1);
- Pipet 50 μ l (2);
- Khay ủ mẫu (3);
- Tủ lạnh để bảo quản hóa chất 2-8 độ C;
- Đầu cân phù hợp với pipet;
- Đồng hồ đếm ngược (count down timer).



1.2. Sinh phẩm

- BD FACSCCount Reagent Kit: MS: 339010
- BD FACSCCount Control Kit: MS: 340166
- Dung dịch chạy mẫu (sheath fluid): MS: 34200
- Dung dịch cố định (Fixative): MS: 338036
- Ống đựng dung dịch rửa (Cleaning tubes): MS: 343685
- Bình phun chứa dung dịch Javel loãng 1:3.

- Bình phun chứa nước khử ion.

1.3. Bệnh phẩm: Theo hướng dẫn về quy định lấy mẫu bệnh phẩm

2. Quy trình thực hiện

2.1. Vận hành máy

- Bước 1: Kiểm tra phần chất lỏng trong máy

+ Kiểm tra bình Sheath (bình dung dịch chạy máy) xem có đủ dịch để phân tích không? Có hờ không. Nếu không đủ dịch phải bỏ xung dịch sheath, nếu nắp vặn chưa chặt phải nắp chặt lại;

+ Kiểm tra bình Waste nếu đầy phải đổ bỏ dịch thải và lắp lại vào máy. Chú ý vặn chặt nắp bình chức chất thải;

+ Kiểm tra bọt khí trong Flow-cell, nếu có bọt khí phải tiến hành chạy môi hệ thống để đuổi khí khỏi buồng Flow-cell.

- Bước 2: Khởi động máy

+ Kiểm tra xem đĩa mềm đã vào đúng vị trí trong ổ đĩa chưa;

+ Bật công tắc khởi động;

+ Quan sát hiển thị trên màn hình, xuất hiện chữ:

Instrument warmup

Remaining time: 15:00

+ Nếu màn hình không

- Bước 3: Xả bọt khí (drain) khi phát hiện bọt khí trong buồng đếm

+ Vào UTILITY.

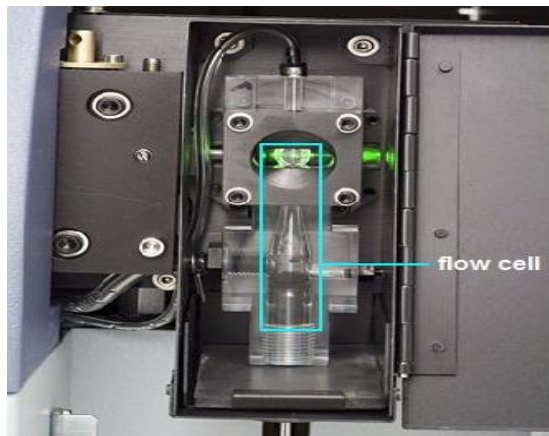
+ Nhấn phím DRAIN.

+ Cho nước cất vào ống tube.

+ Nhấn phím DRAIN 1 lần nữa.

+ Quan sát chuyển động của chất lỏng trong Flow-cell đến trạng thái KHÔNG CÒN chất lỏng thì nhấn phím STOP.

+ Quan sát chuyển động của chất lỏng trong Flow-cell đến trạng thái ĐẦY chất lỏng thì kết thúc quá trình xả bọt khí.



- **Bước 4: Quy trình rửa máy hàng ngày được thực hiện trước, sau ngày chạy máy và sau khi chạy 20 mẫu.**

+ Chuẩn bị dung dịch rửa: 01 ống BLEACH (tỉ lệ 1:3) hay ống dung dịch FACSCLEAN, 01 ống dung dịch FACSRINSE.

+ Chọn UTILITY trên màn hình chính.

+ Chọn CLEAN - chọn DAILY.

+ Đặt ống dung dịch BLEACH hay FACSCLEAN vào vị trí.

+ Nhấn phím RUN, hệ thống sẽ chạy rửa trong 3 phút.

+ Sau đó đặt ống FACSRINSE vào vị trí.

+ Nhấn phím RUN, hệ thống sẽ chạy rửa trong 3 phút.

2.2. Chạy mẫu chứng

- Chuẩn bị mẫu chứng:

+ Lấy 03 ống hoá chất T-CD4 từ BD FACSCount Reagent Kit, dùng bút marker ghi L (viết tắt cho LOW), M (viết tắt cho MEDIUM), H (viết tắt cho HIGH), dùng máy vortex , trộn đều 03 ống hóa chất trên.



+ Lắc ống máu phần toàn phần của người bình thường (lắc xuôi và ngược 5 – 10 lần).

+ Dùng máy mở nắp sinh phẩm CORING STATION đục lỗ 03 ống hóa chất LOW (L), MEDIUM (M) và HIGH (H).

+ Cho 50 μ l máu phần toàn phần của người bình thường đã lắc đều ở trên vào mỗi ống hóa chất LOW, MEDIUM, HIGH.

+ Đậy nắp 03 ống hóa chất trên, dùng máy vortex trộn đều 03 ống trên.

+ Ủ 3 ống này trong 30 phút ở nhiệt độ 20-25 độ C, trong tối (sử dụng khay ủ mẫu đi kèm).

+ Sau khi ủ xong, cho 50 μ l dung dịch cố định (FIXATIVE SOLUTION) vào mỗi ống hóa chất trên.

+ Dùng máy vortex trộn đều các ống.

+ Lấy 1 bộ hóa chất control (BD FACSCount Control Kit) gồm ZERO-LOW, MEDIUM-HIGH (2 cặp).

+ Dùng máy vortex trộn đều 2 cặp ống hóa chất control.

+ Dùng CORING STATION đục lỗ 02 cặp hóa chất control.

+ Cho lần lượt 50 μ l dung dịch hóa chất control trong 3 ống LOW, MEDIUM, HIGH-CONTROL vào 03 ống hóa chất T-CD4 đã được đánh dấu tương ứng với LOW (L), MEDIUM (M), HIGH (H).

- Chạy mẫu chứng: Công việc chạy mẫu chứng được thực hiện trước khi chạy mẫu bệnh nhân. Gồm các bước sau:

+ Chọn CONTROL từ màn hình chính.

+ Nhập số LOT CODE của các cặp CONTROL BEAD, số đếm của từng ống LOW-MEDIUM-HIGH.

+ Sau khi nhập đầy đủ các thông số thì chọn CONFIRM.

+ Nhập số LOT CODE và giá trị đếm của ống hóa chất T-CD4 dùng để chạy control.

+ Sau khi nhập đầy đủ các thông số thì chọn CONFIRM.

+ Nhập số ID (thông thường nhập ngày chạy control tương ứng).

+ Chọn ENTER.

+ Chạy lần lượt các ống LOW-MEDIUM-HIGH. Kết quả sẽ thu được sau khi chạy xong 03 ống LOW-MEDIUM-HIGH.

Sau khi chạy mẫu chứng, kết quả được biểu diễn lên biểu đồ Leveys_Jenning (phần mềm thiết kế sẵn trong máy tính). Nếu kết quả đạt yêu cầu thì tiến hành xử lý và phân tích mẫu.

Nếu kết quả không đạt yêu cầu, tiến hành xem xét đánh giá nguyên nhân: do hóa chất, do kỹ thuật, do máy để khắc phục.

2.3. Phân tích mẫu

- Chuẩn bị mẫu:

+ Ghi mã số bệnh nhân vào từng ống hóa chất T-CD4 (thông nhất đánh mã số cho ống máu của bệnh nhân và mã số ghi trên ống hóa chất).

+ Dùng máy vortex trộn đều các ống hóa chất.

+ Lắc ống mẫu bệnh phẩm xuôi ngược 5 -10 lần.

- + Dùng máy mở nắp sinh phẩm CORING STATION đục lỗ các ống hóa chất trên.
 - + Cho 50µl máu toàn phần vào mỗi ống hóa chất.
 - + Đậy nắp các ống hóa chất trên, dùng máy vortex trộn đều các ống trên.
 - + Ủ các ống trong 30 phút ở nhiệt độ 20-25 độ C.
 - + Sau khi ủ xong, cho 50µl dung dịch cố định (FIXATIVE SOLUTION) vào mỗi ống hóa chất trên.
 - + Dùng máy vortex trộn đều các ống.
 - + Tiến hành chạy các mẫu bệnh phẩm trên máy.
 - Chạy mẫu:
 - + Chọn SAMPLE từ màn hình chính.
 - + Nhập số LOT CODE của các ống hóa chất, số đếm hạt bead tham chiếu của ống hóa chất.
 - + Sau khi nhập đầy đủ các thông số thì chọn CONFIRM.
 - + Nhập số ACC (mã số mẫu bệnh phẩm tương ứng) vào máy.
 - + Chọn ENTER.
 - + Chạy lần lượt các ống bệnh phẩm.
- Máy sẽ tự động phân tích và in kết quả cho từng mẫu bệnh phẩm

2.4. Quy trình rửa hệ thống định kỳ

Thực hiện 1 tháng/1 lần hoặc khi thực hiện quy trình rửa hàng ngày mà máy vẫn tắc. Gồm các bước sau:

- Đổ dung dịch SHEATH trong bình chứa số 2 ra, cho vào 1-2 lít dung dịch FACSCLEAN;
- Tháo phần kết nối với phin lọc ra , nối đường ống phần SHEATH vào;
- Chọn UTILITY trên màn hình chính;
- Chọn CLEAN – chọn LONG;
- Đặt ống dung dịch BLEACH hay FACSCLEAN vào vị trí;
- Nhấn phím RUN, hệ thống sẽ chạy rửa trong 30 phút;
- Đổ dung dịch FACSCLEAN còn dư trong bình chứa số 2 ra, tráng bình bằng nước cất hoặc bằng dung dịch FACSRINSE. Sau đó, cho 1-2 lit dung dịch FACSRINSE vào trong bình chứa số 2;
- Đặt 1 ống chứa dung dịch FACSRINSE vào vị trí;
- Nhấn phím RUN, hệ thống sẽ chạy rửa trong 30 phút;
- Sau khi thực hiện chương trình CLEAN- RINSE xong, chọn UTILITY để về màn hình chính;
- Đổ dung dịch FACSRINSE trong bình chứa số 2 ra, tráng bình bằng dung dịch SHEATH, sau đó cho dung dịch SHEATH vào bình để chạy máy. Nối lại hệ

thống dây dẫn dung dịch để dung dịch SHEATH có thể chạy qua phin lọc trước khi vào hệ thống Flow Cell.

3. Phân tích và nhận định kết quả

3.1. Phân tích mẫu chứng

<p>Thông tin của giọt bead</p>	<p>BD Biosciences, Immunocytometry Systems BD FACSCount CD4 Software Version 1.0 03/07</p> <p>Control Run Results Lab ID: BD Biosciences Operator: SG</p> <p>Reagent Lot ID: 40192121 Reference Bead Count: 976 beads/ul</p> <p>Control Bead Lot ID : 49041721 Control Bead Counts – beads/ul low : 48 med : 242 high : 970</p> <p>Date: 9/12/05 11:52</p> <p>Control Run : Passed</p> <p>Lab Normal ID: 12345678</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tube</th> <th>CD4:</th> <th>Control</th> <th>CD4:</th> <th></th> </tr> <tr> <td></td> <td>CD4:</td> <td>cells/ul</td> <td>%Beads</td> <td></td> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>beads/ul</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>low:</td> <td>456</td> <td>30.52</td> <td>57</td> </tr> <tr> <td></td> <td>medium:</td> <td>494</td> <td>28.33</td> <td>251</td> </tr> <tr> <td></td> <td>high:</td> <td>483</td> <td>28.42</td> <td>1001</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Mean:</td> <td>478</td> <td>29.09</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>%CV:</td> <td>4.09</td> <td></td> <td>N/A</td> </tr> </tbody> </table>	Tube	CD4:	Control	CD4:			CD4:	cells/ul	%Beads			beads/ul					low:	456	30.52	57		medium:	494	28.33	251		high:	483	28.42	1001		Mean:	478	29.09			%CV:	4.09		N/A	<p>Thông tin thứ tự các tube</p>
	Tube	CD4:	Control	CD4:																																							
	CD4:	cells/ul	%Beads																																								
	beads/ul																																										
	low:	456	30.52	57																																							
	medium:	494	28.33	251																																							
	high:	483	28.42	1001																																							
	Mean:	478	29.09																																								
	%CV:	4.09		N/A																																							
<p>Kết quả chạy đối chứng</p>		<p>Control Bead Results:</p> <p>R : 1.000 Slope : 1.03 Intercept: 5</p>	<p>Thông kê tuyến tính</p>																																								
	<p>Reference Bead Cluster Locations:</p> <p>low tube : 207, 208 medium tube : 206, 207 high tube : 207, 208</p>																																										

3.2. Phân tích kết quả bệnh nhân

BD Biosciences, Immunocytometry Systems BD FACSCount CD4 Software Version 1.0 03/07	
Sample Run Results	
Lab ID: BD Biosciences Operator: JH	
Reagent Lot ID: 40192121 Reference Bead Count: 976 beads/ μ l	Thông tin của thuốc thử
Date: 8/28/05 14:22	
Last Control Run : Passed Control Run Date : 5/28/05 11:52 Control Run Reagent Lot ID: 40192121 Control Run Control Lot ID: 49041721	Kết quả chạy đối chứng cuối cùng
Accession #: 122505	Mã số bệnh nhân #
CD4 Counts: 481 [cells/ μ l] %CD4 : 30.17 [%]	Kết quả bệnh nhân

4. Phát hiện và xử lý sự cố

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
101 - 159	Lỗi hệ thống. Khởi động lại máy. Nếu máy vẫn còn báo các lỗi này, liên hệ bộ phận kỹ thuật BD	Lỗi phần mềm máy. Không liên quan đến chất lượng tube đối chứng hay tube mẫu	Khởi động lại máy.
202	Tốc độ đếm hạt tham chiếu quá thấp	Kim hút mẫu bị nghẹt	Thực hiện quy trình vệ sinh máy.
		Tube chưa được lắc đều	Cài đặt lại tốc độ lắc sao cho khi lắc, chất lỏng trong tube có thể dâng lên được đến phần trên cùng của tube. Lắc trong vòng 6 giây, sau đó chạy lại tube đó.
		Chạy nhầm các tube đối chứng (có nắp màu đỏ, tím và xanh), không phải tube mẫu	Kiểm tra lại các tube đối chứng trên giá đỡ mẫu. Chạy lại tube mẫu bệnh nhân.
		Không có mẫu trong tube (mẫu đã hết)	Chuẩn bị lại tube đó. Nếu có bọt khí trong flow cell, xem lại hướng dẫn để loại bỏ bọt khí.
		Không có tube hóa chất trong giá đỡ mẫu.	Đảm bảo không có khí trong flow cell. Đặt tube mẫu vào giá đỡ mẫu. Nếu có bọt khí trong flow cell, xem lại hướng dẫn để loại bỏ bọt khí.
		Dung dịch sheath trong bình chứa đã hết hoặc còn ít	Đổ thêm sheath vào bình chứa.
		Bình chứa chất thải đầy	Thay bình chất thải khác.
		Các lỗ thông hơi trên nắp của bình chất thải bị nghẹt	Thay nắp khác.
203	Tốc độ đếm hạt tham chiếu quá cao	Cửa trong hay cửa ngoài của hệ thống quang học bị mở	Đóng các cửa lại.
		Có bọt khí trong flow cell	Loại bỏ bọt khí. Xem lại cách môi hệ thống (priming) .
		Có bọt khí trong bình lọc sheath	Thông khí trong bình lọc sheath.
		Dung dịch sheath trong bình	Đổ thêm sheath vào bình

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
		chứa đã hết hoặc còn ít	chứa.
		Bình lọc sheath không được kết nối	Kết nối lại bình lọc sheath. Xem lại chu trình vệ sinh máy
204	Công suất đèn laser thấp (x.xxx mWatts)	Có bọt khí trong flow cell	Loại bỏ bọt khí. Xem lại cách môi hệ thống (priming)
		Flow cell bị dơ	Thực hiện chu trình vệ sinh máy.
		Nguồn laser yếu	Liên hệ đại diện BD.
206	Lỗi đầu đọc laser	Có thể do lỗi của phần cứng (hardware)	Khởi động lại máy. Nếu lỗi vẫn còn, liên hệ đại diện BD.
207	Mức dung dịch sheath quá thấp	Dung dịch sheath trong bình chứa đã hết hoặc còn ít	Đổ thêm sheath vào bình chứa.
		Bộ phận cảm biến hoặc bộ phận kết nối của bình sheath không được gắn chặt	Kiểm tra và gắn lại cho chặt
		Bộ phận cảm biến hoặc bộ phận kết nối của bình sheath bị vỡ	Liên hệ đại diện BD.
208	Bình chất thải bị đầy	Bình chứa chất thải đầy	Thay bình chất thải khác.
		Các lỗ thông hơi trên nắp của bình chất thải bị nghẹt	Thay nắp khác.
		Bộ phận cảm biến hoặc bộ phận kết nối của bình chất thải không được gắn chặt	Kiểm tra và gắn lại cho chặt.
		Bộ phận cảm biến hoặc bộ phận kết nối của bình chất thải bị vỡ	Liên hệ đại diện BD.
301	Số lượng tế bào lympho XXXX (BD khuyến cáo phải lớn hơn 2000)	Tube chưa được lắc đều	Cài đặt lại tốc độ lắc sao cho khi lắc, chất lỏng trong tube có thể dâng lên được đến phần trên cùng của tube. Lắc trong vòng 6 giây, sau đó chạy lại tube đó.
		Thể tích dịch hút không chính xác	Xác định lại thể tích dịch pipet hút đúng 50µl. Xem trang 46.
		Tube chân không (tube mẫu máu) chưa được lắc đều	Đảo ngược tube mẫu máu 5 - 10 lần.
		Trong tube đối chứng hoặc tube mẫu, không có máu hoặc có nhưng thể tích không đủ (<50 µl)	Chuẩn bị lại các tube mẫu và tube đối chứng). Kiểm tra lại kỹ thuật hút pipet .

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
		Kim hút mẫu bị nghẹt	Thực hiện quy trình rửa máy.
303	Quần thể tế bào T-CD4 dương tính không tách biệt rõ ràng	Sau khi cho máu vào, thời gian ủ mẫu chưa đủ	Chuẩn bị mẫu lại. Ủ 30 phút.
		Chưa bổ sung dung dịch cố định	Chuẩn bị mẫu lại. Cho thêm dung dịch cố định vào tube sau khi mẫu đã được ủ 30 – 40 phút..
		Hóa chất bị hư	Kiểm tra lại hạn sử dụng và xem xét liệu hoá chất có tiếp xúc với ánh sáng hay nhiệt độ cao không. Nếu hóa chất được lưu trữ không đúng cách, dùng lô hóa chất mới.
		Trữ mẫu không đúng	Chuẩn bị mẫu lại. Trữ mẫu trong bóng tối tại nhiệt độ phòng.
		Có bọt khí trong flow cell	Loại bỏ bọt khí. Xem lại cách môi hệ thống (priming)
		Có bọt khí trong bình lọc sheath	Thông khí trong bình lọc sheath.
		Flow cell bị dơ	Thực hiện chu trình vệ sinh máy.
304	Sự phân chia giữa quần thể tế bào CD4 âm tính và các mảnh vỡ tế bào không rõ ràng	Sau khi cho máu vào, thời gian ủ mẫu chưa đủ	Chuẩn bị mẫu lại. Ủ 30 phút.
		Chưa bổ sung dung dịch cố định	Chuẩn bị mẫu lại. Cho thêm dung dịch cố định vào tube sau khi mẫu đã được ủ 30 – 40 phút..
		Mẫu máu toàn phần đã được lấy quá 24 giờ hoặc mẫu đã được chuẩn bị quá 48 giờ	Chuẩn bị mẫu lại, sử dụng mẫu máu toàn phần mới được lấy trong vòng 24 giờ. Xem lại hướng dẫn đi kèm hoá chất CD4 của BD (Backage insert).
		Hóa chất bị hư	Kiểm tra lại hạn sử dụng và xem xét liệu hoá chất có tiếp xúc với ánh sáng hay nhiệt độ cao không. Nếu hóa chất được lưu trữ không đúng cách, dùng lô hóa chất mới.
		Trữ mẫu không đúng	Chuẩn bị mẫu lại. Trữ mẫu trong bóng tối tại nhiệt độ phòng.

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
		Mẫu đã được chuẩn bị quá lâu	Chuẩn bị mẫu . Chỉ chạy các mẫu đã được chuẩn bị trong khoảng thời gian được khuyến cáo. Xem lại tài liệu FacsCount
		Có bọt khí trong flow cell	Loại bỏ bọt khí. Xem lại cách môi hệ thống (priming) .
		Có bọt khí trong bình lọc sheath	Thông khí trong bình lọc sheath.
305	Sự phân chia giữa quần thể tế bào CD4 âm tính và quần thể tế bào hạt không rõ ràng	Sau khi cho máu vào, thời gian ủ mẫu chưa đủ	Chuẩn bị mẫu lại. Ủ 30 phút.
		Chưa bổ sung dung dịch cố định	Chuẩn bị mẫu lại. Cho thêm dung dịch cố định vào tube sau khi mẫu đã được ủ 30 – 40 phút..
		Mẫu máu toàn phần đã được lấy quá 24 giờ hoặc mẫu đã được chuẩn bị quá 48 giờ	Chuẩn bị mẫu lại, sử dụng mẫu máu toàn phần mới được lấy trong vòng 24 giờ. Xem lại hướng dẫn đi kèm hoá chất CD4 của BD (Backage insert).
		Hóa chất bị hư	Kiểm tra lại hạn sử dụng và xem xét liệu hoá chất có tiếp xúc với ánh sáng hay nhiệt độ cao không. Nếu hóa chất được lưu trữ không đúng cách, dùng lô hóa chất mới.
		Trữ mẫu không đúng	Chuẩn bị mẫu lại. Trữ mẫu trong bóng tối tại nhiệt độ phòng.
		Mẫu đã được chuẩn bị quá lâu	Chuẩn bị mẫu lại. Chỉ chạy các mẫu đã được chuẩn bị trong khoảng thời gian được khuyến cáo. Xem lại tài liệu FacsCount
		Có bọt khí trong flow cell	Loại bỏ bọt khí. Xem lại cách môi hệ thống (priming) .
		Có bọt khí trong bình lọc	Thông khí trong bình lọc

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
		sheath	sheath.
312	Số lượng hạt đối chứng vượt khoảng giới hạn	Các tube đối chứng được chuẩn bị chưa tốt	Phải bảo đảm các tube đối chứng đã được chuẩn bị tốt: CD4-thấp, CD4- trung bình, CD4- cao. Chú ý không sử dụng tube chứng không (Zero Control)
		Số lượng hạt đối chứng nhập vào máy chưa đúng	Kiểm tra lại số hạt đối chứng nhập vào máy. Nếu chưa đúng, nhập lại, sau đó chạy các tube đối chứng lại.
		Các tube đối chứng không chạy theo đúng trình tự hoặc các hạt đối chứng cho vào các tube chưa tương ứng	Chạy theo đúng trình tự sau: - Tube CD4 – thấp - Tube CD4 – trung bình - Tube CD4 – cao
		Sau khi cho máu vào, thời gian ủ mẫu chưa đủ	Chuẩn bị mẫu lại. Ủ 30 phút.
		Chưa bổ sung dung dịch cố định	Chuẩn bị mẫu lại. Cho thêm dung dịch cố định vào tube sau khi mẫu đã được ủ 30 – 40 phút..
		Máu được cho vào 2 lần trong cùng một tube	Chuẩn bị lại các ống đối chứng, sử dụng đúng 50µl máu
		Kit đối chứng không được lưu trữ thẳng đứng hoặc chưa được lắc đều trước khi sử dụng	Lắc đều các hạt đối chứng, chuẩn bị lại các tube đối chứng.
		Thể tích dịch được hút chưa chính xác	Kiểm tra lại thao tác hút dịch bằng pipet.
313	Các hạt đối chứng có lẫn trong mẫu bệnh nhân	Các hạt đối chứng đã được cho vào tube mẫu bệnh nhân	Chuẩn bị mẫu lại. Không được cho các hạt đối chứng vào tube mẫu bệnh, chỉ cho vào các tube đối chứng.
		Flow cell bị dơ	Thực hiện chu trình vệ sinh máy. .
314	Số tế bào CD4 dương tính < 1	Mẫu máu chưa được cho vào tube	Chuẩn bị mẫu lại.
		Hoá chất bị hỏng	Kiểm tra lại hạn sử dụng và xem xét liệu hoá chất có tiếp xúc với ánh sáng hay nhiệt độ cao không. Nếu hóa chất được

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
			lưu trữ không đúng cách, dùng lô hóa chất mới.
315	Số tế bào CD4 dương tính < 50	Mẫu máu sử dụng trong tube đối chứng không phải mẫu máu bình thường	Chuẩn bị lại tube đối chứng, sử dụng mẫu máu bình thường (số lượng CD4 > 50 tế bào/ μ l).
316	Số tế bào CD4 dương tính > 5000	Mẫu máu sử dụng trong tube đối chứng không phải mẫu máu bình thường	Chuẩn bị lại tube đối chứng, sử dụng mẫu máu bình thường (số lượng CD4 < 5000 tế bào/ μ l).
317	%CD4 < 10%	Mẫu máu sử dụng trong tube đối chứng không phải mẫu máu bình thường	Chuẩn bị lại tube đối chứng, sử dụng mẫu máu bình thường (% CD4 > 10%).
318	%CD4 > 65%	Mẫu máu sử dụng trong tube đối chứng không phải mẫu máu bình thường	Chuẩn bị lại tube đối chứng, sử dụng mẫu máu bình thường (% CD4 < 65%).
319 – 322	Việc khoang vùng các hạt tham chiếu (trái, phải, trên cùng, dưới cùng) bị lỗi	Số ID của lô hóa chất nhập vào máy không đúng	Kiểm tra lại ID của lô hóa chất sử dụng
		Hoá chất bị hư	Kiểm tra lại hạn sử dụng và xem xét liệu hoá chất có tiếp xúc với ánh sáng hay nhiệt độ cao không. Nếu hóa chất được lưu trữ không đúng cách, dùng lô hóa chất mới.
		Có bọt khí trong flow cell	Loại bỏ bọt khí. Xem lại cách môi hệ thống (priming)
		Flow cell bị dơ	Thực hiện chu trình vệ sinh máy. .
		Công suất đèn laser thấp	Liên hệ đại diện BD.
323 - 326	Việc khoang vùng các hạt đối chứng (trái, phải, trên cùng, dưới cùng) bị lỗi	Số ID của lô hóa chất nhập vào máy không đúng	Kiểm tra lại ID của lô hóa chất sử dụng.
		Có bọt khí trong flow cell	Loại bỏ bọt khí. Xem lại cách môi hệ thống (priming)
		Công suất đèn laser thấp	Liên hệ đại diện BD.
		Có bọt khí trong bình lọc sheath	Thông khí trong bình lọc sheath.
327 – 329	Không xác định quần thể lympho, quần thể CD4 dương	Trong tube đối chứng hoặc tube mẫu, không có máu hoặc có nhưng thể tích không đủ (<50 μ l)	Chuẩn bị lại các tube mẫu và tube đối chứng .Kiểm tra lại kỹ thuật hút pipet

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
	tính, âm tính	Hoá chất bị hư	Kiểm tra lại hạn sử dụng và xem xét liệu hoá chất có tiếp xúc với ánh sáng hay nhiệt độ cao không. Nếu hóa chất được lưu trữ không đúng cách, dùng lô hóa chất mới.
		Mẫu máu toàn phần đã được lấy quá 24 giờ hoặc mẫu đã được chuẩn bị quá 48 giờ	Chuẩn bị mẫu lại, sử dụng mẫu máu toàn phần mới được lấy trong vòng 24 giờ. Xem lại hướng dẫn đi kèm hoá chất CD4 của BD (Backage insert).
		Sau khi cho máu vào, thời gian ủ mẫu chưa đủ	Chuẩn bị mẫu lại. Ủ 30 phút.
		Tube chưa được lắc đều	Cài đặt lại tốc độ lắc sao cho khi lắc, chất lỏng trong tube có thể dâng lên được đến phần trên cùng của tube. Lắc trong vòng 6 giây, sau đó chạy lại tube đó.
		Thế tích dịch hút không chính xác	Xác định lại thế tích dịch mà pipet hút đúng 50µl.
		Tube chân không (tube mẫu máu) chưa được lắc đều	Đảo ngược tube mẫu máu 5 - 10 lần.
		Kim hút mẫu bị nghẹt	Thực hiện quy trình rửa máy
		Số tế bào CD4 nhỏ hơn 50 tế bào/µl	Không thể thực hiện phân tích các mẫu bệnh này.
330	Lỗi bộ nhớ. Chạy mẫu lại	Máy có vấn đề trong việc phân vùng bộ nhớ	Chạy lại tube đó.
	Vị trí của các mảnh vỡ quá cao	Hoá chất bị hư	Kiểm tra lại hạn sử dụng và xem xét liệu hoá chất có tiếp xúc với ánh sáng hay nhiệt độ cao không. Nếu hóa chất được lưu trữ không đúng cách, dùng lô hóa chất mới.
		Số ID của lô hóa chất nhập vào máy không đúng	Kiểm tra lại ID của lô hóa chất sử dụng.
		Mẫu máu toàn phần đã được lấy quá 24 giờ hoặc mẫu đã được chuẩn bị quá 48 giờ	Chuẩn bị mẫu lại, sử dụng mẫu máu toàn phần mới được lấy trong vòng 24 giờ. Xem lại hướng dẫn đi kèm hoá chất CD4 của BD (Backage insert).
		Có bọt khí trong flow cell	Loại bỏ bọt khí. Xem lại cách

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
			môi hệ thống (priming) .
		Có bọt khí trong bình lọc sheath	Thông khí trong bình lọc sheath.
		Flow cell bị dơ	Thực hiện chu trình vệ sinh máy. .
334	Sự phân chia giữa quần thể tế bào CD4 âm tính và quần thể mono không rõ ràng	Sau khi cho máu vào, thời gian ủ mẫu chưa đủ	Chuẩn bị mẫu lại. Ủ 30 phút.
		Trữ mẫu không đúng	Chuẩn bị mẫu lại. Trữ mẫu trong bóng tối tại nhiệt độ phòng.
		Mẫu máu toàn phần đã được lấy quá 24 giờ hoặc mẫu đã được chuẩn bị quá 48 giờ	Chuẩn bị mẫu lại, sử dụng mẫu máu toàn phần mới được lấy trong vòng 24 giờ. Xem lại hướng dẫn đi kèm hoá chất CD4 của BD (Backage insert).
		Hoá chất bị hư	Kiểm tra lại hạn sử dụng và xem xét liệu hoá chất có tiếp xúc với ánh sáng hay nhiệt độ cao không. Nếu hóa chất được lưu trữ không đúng cách, dùng lô hóa chất mới.
		Có bọt khí trong flow cell	Loại bỏ bọt khí. Xem lại cách môi hệ thống (priming) .
		Có bọt khí trong bình lọc sheath	Thông khí trong bình lọc sheath.
335	Vị trí các hạt tham chiếu bị sai lệch	Số ID của lô hóa chất nhập vào máy không đúng	Kiểm tra lại ID của lô hóa chất sử dụng.
336	Ngưỡng (threshold) rất gần với CD4+	Sau khi cho máu vào, thời gian ủ mẫu chưa đủ	Chuẩn bị mẫu lại. Ủ 30 phút.
		Chưa bổ sung dung dịch cố định	Chuẩn bị mẫu lại. Cho thêm dung dịch cố định vào tube sau khi mẫu đã được ủ 30 – 40 phút..
		Mẫu máu toàn phần đã được lấy quá 24 giờ hoặc mẫu đã được chuẩn bị quá 48 giờ	Chuẩn bị mẫu lại, sử dụng mẫu máu toàn phần mới được lấy trong vòng 24 giờ. Xem lại hướng dẫn đi kèm hoá chất CD4 của BD (Backage insert).
		Hóa chất bị hư	Kiểm tra lại hạn sử dụng và xem xét liệu hoá chất có tiếp xúc với ánh sáng hay nhiệt độ

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
			cao không. Nếu hóa chất được lưu trữ không đúng cách, dùng lô hóa chất mới.
		Trữ mẫu không đúng	Chuẩn bị mẫu lại. Trữ mẫu trong bóng tối tại nhiệt độ phòng.
		Không có tube hóa chất trong giá đỡ mẫu.	Đảm bảo không có khí trong flow cell. Đặt tube mẫu vào giá đỡ mẫu. Nếu có bọt khí trong flow cell, xem lại hướng dẫn để loại bỏ bọt khí.
		Không có mẫu trong tube (mẫu đã hết)	Chuẩn bị lại tube đó. Nếu có bọt khí trong flow cell, xem lại hướng dẫn để loại bỏ bọt khí.
		Chạy nhầm các tube đối chứng (có nắp màu đỏ, tím và xanh), không phải tube mẫu	Kiểm tra lại các tube đối chứng trên giá đỡ mẫu. Chạy lại tube mẫu bệnh nhân.
		Số ID của lô hóa chất nhập vào máy không đúng	Kiểm tra lại ID của lô hóa chất sử dụng.
		Có bọt khí trong flow cell	Loại bỏ bọt khí. Xem lại cách môi hệ thống (priming).
		Có bọt khí trong bình lọc sheath	Thông khí trong bình lọc sheath.
		Cửa trong hay cửa ngoài của hệ thống quang học bị mở	Đóng các cửa lại.
		Máy chưa được cân chỉnh tốt	Liên hệ đại diện BD
401	Độ chính xác của việc đếm tế bào CD4 dương tính bị sai lệch	Các tube đối chứng chưa được lắc đều	Lắc lại các tube đối chứng, sau đó chạy lại. Nếu máy vẫn còn thông báo lỗi, chuẩn bị các tube đối chứng mới.
		Thể tích dịch được hút chưa chính xác	Kiểm tra lại thao tác hút dịch bằng pipet. .
		Chạy nhầm các tube đối chứng (có nắp màu đỏ, tím và xanh), không phải tube mẫu	Kiểm tra lại các tube đối chứng trên giá đỡ mẫu. Chạy lại tube mẫu bệnh nhân.
402	Độ chính xác của việc đếm tế bào CD4 âm tính bị sai lệch	Các tube đối chứng chưa được lắc đều	Lắc lại các tube đối chứng, sau đó chạy lại. Nếu máy vẫn còn thông báo lỗi, chuẩn bị các tube đối chứng mới.

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
		Thể tích dịch được hút chưa chính xác	Kiểm tra lại thao tác hút dịch bằng pipet.
		Chạy nhầm các tube đối chứng (có nắp màu đỏ, tím và xanh), không phải tube mẫu	Kiểm tra lại các tube đối chứng trên giá đỡ mẫu. Chạy lại tube mẫu bệnh nhân.
403	Độ dốc vượt ngoài khoảng cho phép	Các tube đối chứng không chạy theo đúng trình tự hoặc các hạt đối chứng cho vào các tube chưa tương ứng	Chạy theo đúng trình tự sau: - Tube CD4 – thấp - Tube CD4 – trung bình - Tube CD4 – cao
		Số lượng hạt đối chứng nhập vào máy chưa đúng	Kiểm tra lại số hạt đối chứng nhập vào máy. Nếu chưa đúng, nhập lại, sau đó chạy các tube đối chứng lại.
		Thể tích dịch đối chứng hút chưa chính xác	Chuẩn bị các tube đối chứng lại. Xem lại hướng dẫn kỹ thuật hút pipet cho đúng
		Kit đối chứng không được lưu trữ thẳng đứng hoặc chưa được lắc đều trước khi sử dụng	Lắc đều các hạt đối chứng, chuẩn bị lại các tube đối chứng. Nếu máy vẫn còn báo lỗi, bỏ các tube đối chứng cũ và chuẩn bị lại các tube đối chứng mới.
		Thể tích dịch hút chưa chính xác	Kiểm tra lại thao tác hút dịch bằng pipet.
404	Giá trị điểm chẩn vượt ngoài khoảng cho phép	Các tube đối chứng không chạy theo đúng trình tự hoặc các hạt đối chứng cho vào các tube chưa tương ứng	Chạy theo đúng trình tự sau: - Tube CD4 – thấp - Tube CD4 – trung bình - Tube CD4 – cao
		Số lượng hạt đối chứng nhập vào máy chưa đúng	Kiểm tra lại số hạt đối chứng nhập vào máy. Nếu chưa đúng, nhập lại, sau đó chạy các tube đối chứng lại.
		Thể tích dịch đối chứng chưa được hút chính xác	Chuẩn bị các tube đối chứng lại. Xem lại hướng dẫn kỹ thuật hút pipet cho đúng .
		Kit đối chứng không được lưu trữ thẳng đứng hoặc chưa được lắc đều trước khi sử dụng	Lắc đều các hạt đối chứng, chuẩn bị lại các tube đối chứng. Nếu máy vẫn còn báo lỗi, bỏ các tube đối chứng cũ và chuẩn bị lại các tube đối chứng mới.

Mã số	Thông báo hiển thị trên máy	Các nguyên nhân	Hướng giải quyết
		Thể tích dịch hút chưa chính xác	Kiểm tra lại thao tác hút dịch bằng pipet. .
405	Hệ số tương quan R vượt ngoài khoảng cho phép	Số lượng hạt đối chứng nhập vào máy chưa đúng	Kiểm tra lại số hạt đối chứng nhập vào máy. Nếu chưa đúng, nhập lại, sau đó chạy các tube đối chứng lại.
		Thể tích dịch đối chứng hút chưa chính xác	Chuẩn bị các tube đối chứng lại. Xem lại hướng dẫn kỹ thuật hút pipet cho đúng.

IV. Quy trình đếm tế bào T-CD4 trên máy PCA-GUAVA

Máy PCA – Guava có 1 đèn laser, đọc được 2 màu huỳnh quang và chỉ tiêu FSC. Hệ thống máy này sử dụng bộ kit CD3/CD4 và CD4/CD4% cho phép xác định số lượng tuyệt đối và phần trăm tế bào lympho T-CD4 trong máu toàn phần. Máy Guava xác định thể tích thực khi phân tích mẫu từ đó giúp xác định chính xác số lượng tế bào được phân tích. Hệ thống Guava là thông mở có thể sử dụng các sinh phẩm thay thế. Đây cũng là một dòng máy đếm tế bào lympho T-CD4 với ưu điểm gọn nhẹ, chi phí thấp và có thể di chuyển dễ dàng đến thực địa. Sau thời gian xử lý mẫu khoảng 40 phút, máy có thể đọc kết quả với công suất 10-12 mẫu/giờ.

1. Dụng cụ, hoá chất, bệnh phẩm

1.1. Thiết bị

- Máy đếm tế bào dòng chảy PCA – Guava – Milipore.
- Pipette 10ul, 1000ul.
- Máy lắc vortex.
- Tủ lạnh bảo quản sinh phẩm 4⁰C.

1.2. Dụng cụ, hóa chất

- Kháng thể đơn dòng: Guava Auto CD4/CD4% kit/100 test 4500-0480
- Chuẩn máy Guava check kit 4500-0020
- Dung dịch ly giải hồng cầu 4700-0082
- Tube 1.5ml 16466-064
- Dung dịch rửa máy (Instrument Clean Fluid - ICF) 4200-0140
- Nước được khử ion, nước cất, hoặc nước thẩm thấu ngược.
- Đầu tip 10ul, 1000ul
- Dung dịch Javel (1%).

1.3. Bệnh phẩm: Theo quy định về lấy mẫu bệnh phẩm

2. Kỹ thuật tiến hành

2.1. Vận hành máy

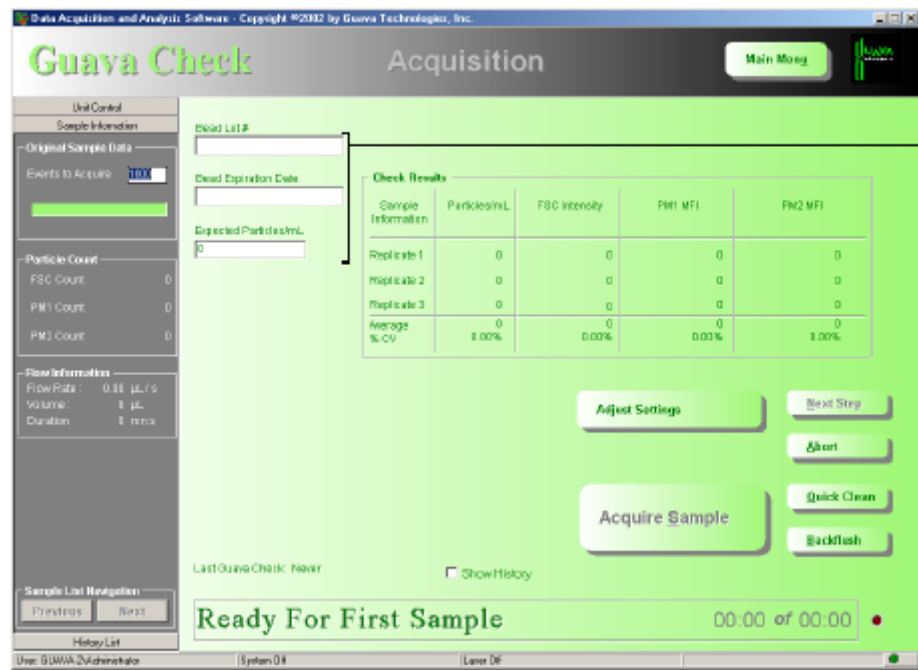
Khởi động máy:

- Máy tính trước và máy Guava sau
- Chờ máy khởi động trong 15 phút

- Nhấp đôi vào phần mềm Guava ® Auto CD4/CD4%
- Rửa máy Quick clean
- Đưa ống nước cất vào vị trí, nâng giá đỡ và nhấn “Quick Clean”
- Máy hiện thông báo kiểm tra đã đưa ống mẫu vào đúng vị trí, nhấn “OK”.
- Máy rửa trong khoảng 30 giây.

Chuẩn máy:

- Chuẩn bị dung dịch thử gồm 2 ống : ống trắng chứa khoảng 1ml Guava check diluent, ống bead có bi được chuẩn bị pha loãng 1/20 (10ul hạt bi + 190 dung dịch pha loãng).
- Nhấp chuột vào vị trí Guava Check trên màn hình chính.
- Nhập các thông số về số lô, hạn sử dụng, số lượng hạt bi chuẩn.



Vị trí nhập

Màn hình nhập các thông số của bộ bi chuẩn máy

- Đổ ống trắng (1ml dd Guava check diluent) vào giá đưa mẫu nâng lên nhẹ nhàng.
- Nhấp chuột vào “Adjust setting”, “OK”. Nhằm thực hiện việc thiết lập tự động ngưỡng và loại trừ nhiễu.
- Khi bước “Adjust setting” hoàn thành, trộn đều ống chứa Guava Check bead (ống bi chuẩn đã pha), đưa ống bead vào giá đưa mẫu, nâng lên và nhấp vào “run 1st replicate”. Chờ đến khi hoàn tất, lấy ống bead ra trộn đều (Vortex) rồi đưa vào và nhấp vào run 2nd replicate, lập lại tương tự cho 3rd replicate.

- Sau khi chạy xong 3 lần, máy sẽ tự động hiển thị kết quả chạy chuẩn máy với các giá trị CV% của số lượng hạt bi, tín hiệu màu huỳnh quang, tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng (FSC).

- Giá trị CV% của số lượng hạt bi phải nhỏ hơn 10%, giá trị CV% của tín hiệu huỳnh quang và FSC của 3 lần chạy phải nhỏ hơn 5%. Các giá trị này sẽ được ghi nhận và vẽ trên biểu đồ Levey – Jennings. Các thông số nền đã đạt được sử dụng trong 1 ngày.

- Nếu tất cả các điều kiện chuẩn máy đều đạt thì tiến hành xử lý mẫu.

- Thực hiện chạy Quick clean để vệ sinh máy sau khi chạy Guava Check và trước khi chạy mẫu đã được chuẩn bị với kit Auto CD4/CD4 %.

2.2. Phân tích mẫu

Xử lý mẫu:

- Ghi mã số hoặc thông tin bệnh phẩm lên tube 1,5 ml.

- Hút 10 µl hỗn hợp dung dịch kháng thể Auto CD4/CD4 % (Auto CD4/CD4 % Antibody Cocktail) cho vào mỗi tube 1,5 ml trên.

Chú ý: Đặt chai “Auto CD4/CD4% Antibody cocktail” trở lại tủ lạnh hoặc trên đá ngay sau khi sử dụng. Không nên để chai “Auto CD4/CD4% Antibody cocktail” ở nhiệt độ môi trường quá lâu.

- Hút 10 µL máu (từ tube EDTA đã được trộn kỹ) cho vào đáy mỗi tube có chứa các hỗn hợp dung dịch kháng thể (Antibody Cocktail).

Chú ý: Máu trong tube phải được trộn đều bằng cách khuấy nhẹ nhàng một vài phút trước khi lấy chia đều cho các mẫu đã chuẩn bị, không để đầu tip pipette nhúng sâu vào trong ống máu. (không quá 5mm)

- Đậy nắp các tube lại và Vortex ngay lập tức các tube khoảng 3-5 giây.

Chú ý: Tránh để máu khô trên mặt của ống. Điều này có thể gây ra kết quả sai sót.

- Ủ khoảng 30 phút ở nhiệt độ phòng (18-25°C) trong bóng tối.

- Hút trực tiếp 380 µl dung dịch ly giải 1X cho vào tube đã ủ xong. Tổng thể tích mẫu/ 1 tube lúc này là 400 µl.

- Vortex ống ngay lập tức ở khoảng 3-5 giây.

- Lặp lại việc thêm dung dịch ly giải 1X và vortex cho mỗi tube còn lại.

- Ủ mẫu khoảng 15 phút ở nhiệt độ phòng (18-25°C) trong tối.

- Các mẫu đã sẵn sàng cho chạy mẫu và phân tích trên thiết bị Guava PCA, sử dụng phần mềm Auto CD4/CD4%.

Chú ý: Tránh ủ quá mẫu, mẫu phải được chạy trong vòng 4 giờ sau khi chuẩn bị.

Chạy mẫu:

- Nhấp vào New data set: chọn Folder nơi muốn lưu file. Nhập tên của file. Nhấp vào Save.

- Điền các thông tin vào ô tương ứng:

+ Lot#: (Số lô hoá chất).

+ Expiration day: (Hạn sử dụng).

+ Dilution factor: 40 (Hệ số pha loãng).

+ Event to acquire: 3000 (Số sự kiện được thu thập).



Nhập thông tin mẫu và hóa chất trước khi chạy mẫu

- Mẫu máu đã xử lý đưa vào giá đỡ mẫu.

- Nhập mã code của bệnh nhân vào “Sample ID” trong mục Sample Information.

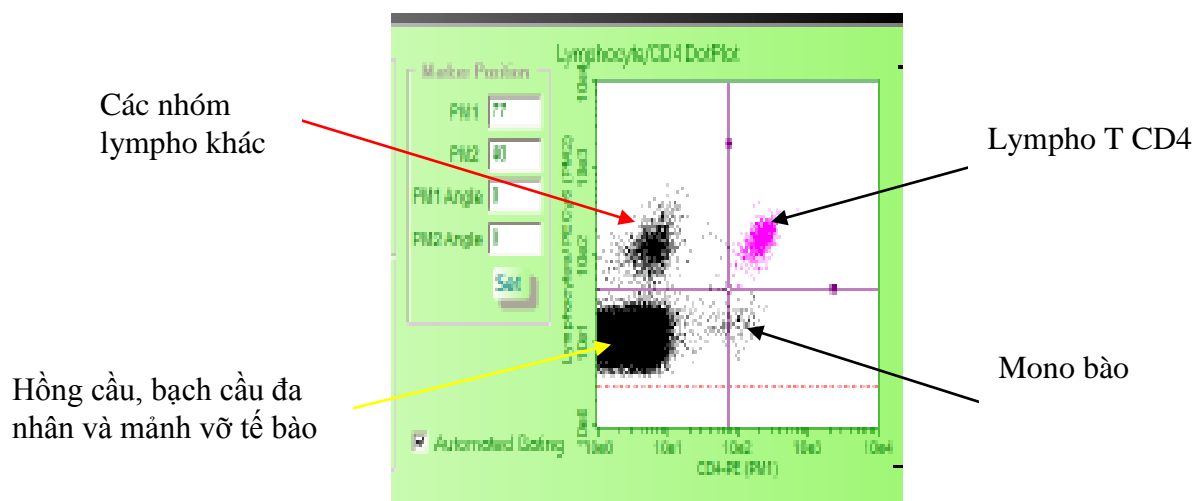
- Vortex mẫu, đặt vào giá. Nhấp vào “acquire next sample”. Chờ cho đến khi hoàn thành.

- Nhấp vào lưu và đóng mẫu khảo sát (save and close current sample). Ngay tại vị trí đó sẽ chuyển sang “Acquire next sample”. Lặp lại các bước trên cho đến khi đọc hết mẫu bệnh.

- Chạy Quick clean trước khi phân tích kết quả

Phân tích kết quả:

- Sau khi chạy xong các mẫu, nhấn vào mục “Go to Analysis”
- Nhấn “Open data set”, chọn file nhấn “Open”.
- Thông thường máy tự động khoanh vùng và phân tích kết quả.
- Trong trường hợp có bất thường về phân bố quần thể, nhấn bỏ chế độ “Automated gate”, chỉnh các vùng phân tách quần thể sao cho vùng tế bào lympho T CD4 và các nhóm tế bào lympho khác tác biệt với quần thể Mono bào cũng như các quần thể hồng cầu, bạch cầu đa nhân và mảnh vỡ tế bào
- Dữ liệu sẽ tự động lưu sau khi điều chỉnh.



Phân vùng quần thể tế bào trong phân tích.

- Nhấn vào “Next” để tiếp tục phân tích mẫu khác.
- In kết quả sau khi phân tích.

Rửa máy và tắt máy sau khi sử dụng:

- Từ màn hình chính nhấn vào “Clean and Shutdown”.
- Đặt 2 ống nước cất vào giá đặt mẫu.
- Nhấn “Start Cleaning”, “OK”. Máy sẽ thực hiện rửa trong 3 phút.
- Thay ống nước cất bằng ống ICF 10% dung dịch Javel vào giá đặt mẫu.
- Nhấn “Start Cleaning”, “OK”. Máy sẽ thực hiện rửa trong 3 phút.
- Quay giá đặt mẫu để đưa ống nước cất thứ hai vào vị trí chạy mẫu.
- Nhấn “Start Cleaning”, “OK”. Máy sẽ thực hiện rửa trong 3 phút.
- Từ màn hình chính nhấn “Exit” để đóng phần mềm và tắt máy.

3. Sự cố và cách khắc phục

Số lượng bi chuẩn máy thấp và không đạt yêu cầu: Thông thường hạt bi chuẩn này khá ổn định, tuy nhiên do kỹ thuật viên không tuân thủ nghiêm ngặt quy trình rửa máy dẫn đến tình trạng đóng bám trong ống mao quản nên thể tích thực máy hút được sẽ nhỏ hơn thực tế. Khắc phục bằng cách thông ống mao dẫn với Javel 1% và rửa lại nhiều lần trước khi chuẩn lại máy.

Kết quả thu được có giá trị cao hơn so với thực tế (đánh giá thông qua kết quả mẫu nội kiểm): Thường là do kỹ thuật viên khi hút mẫu để phân máu dính bên ngoài đầu tip quá nhiều do nhúng đầu tip sâu vào trong ống máu. Khắc phục bằng cách khi hút nên hút nhẹ nhàng trên bề mặt thể tích máu.

Sự phân tách các quần thể không tốt: Ví dụ phân vùng tự động của máy để lẫn phân đám quần thể hồng cầu, bạch cầu đa nhân và mảnh vỡ tế bào vào phân các nhóm lympho bào, hoặc khoanh vùng nhầm tế bào mono vào quần thể lympho T CD4 mẫu lưu trữ ở thời gian quá lâu có thể gây ra hiện tượng trên. Khắc phục bằng cách lấy mẫu lại.

Số lượng: Để tránh hiện tượng trên cần tuân thủ chặt chẽ quy trình rửa máy.

Những lỗi về máy có thể tham khảo tài liệu của nhà sản xuất.

V. Quy trình đếm tế bào T-CD4 trên máy PIMA

Máy Pima Analyzer sử dụng một microchip sinh học kết hợp với hệ thống đầu đọc tín hiệu và máy quay kỹ thuật số, cho phép xác định chính xác số lượng và phần trăm số tế bào lympho T-CD4 trong máu toàn phần được nhuộm và cố định trên chip sinh học. Máy có công suất 3 mẫu/giờ.

1. Dụng cụ, hoá chất, bệnh phẩm

1.1. Thiết bị

- Máy đếm tế bào Alere – PIMA.
- Máy in.

1.2. Sinh phẩm

- Thanh kiểm chứng – thanh Bead (Pima Bead Standard) bao gồm một thanh có giá trị ở mức thấp (low) và một thanh có giá trị ở mức trung bình (normal);
- Thanh đếm tế bào CD4 – thanh Cartridge (Pima Test Cartridge)

1.3. Bệnh phẩm

Mẫu máu toàn phần được lấy theo hướng dẫn về lấy mẫu máu (tham khảo quy trình lấy mẫu máu tại mục V)

2. Kỹ thuật tiến hành

2.1. Vận hành máy

- Máy được khởi động và vận hành bằng nguồn điện từ pin có trong máy hoặc thông qua kết nối trực tiếp với nguồn điện xoay chiều.
- Bật máy bằng cách nhấn và giữ nút khởi động màu da cam ở đằng sau máy cho đến khi có tiếng bíp thì bỏ tay ra. Chờ máy khởi động trong 2 phút.



Nút khởi động máy

2.2. Chuẩn máy

- Thực hiện chuẩn máy hàng ngày trước khi tiến hành trên mẫu bệnh nhân.

- Sử dụng hai thanh mẫu kiểm chứng (Pima Bead Standard) có giá trị thấp và trung bình để chuẩn máy.

Lưu ý: Hạn sử dụng của thanh Bead là 06 tháng kể từ ngày mở hộp (tương đương 120 lần chạy), do đó, phải ghi ngày mở và ngày dự kiến hết hạn sử dụng lên hộp để tiện theo dõi.

Các bước tiến hành:

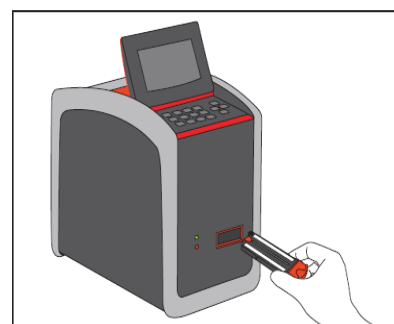
Bước 1: Khi màn hình xuất hiện cụm từ “Run test press OK” (Chạy xét nghiệm, nhấn OK) thì bấm phím (phím OK) trên bàn phím của máy Pima.



Cửa sổ phía trước máy mở ra, màn hình sẽ xuất hiện cụm từ “Insert new cartridge” (đưa thanh thử/thanh bead vào) báo hiệu máy đã sẵn sàng quy trình xét nghiệm. Nếu trong 30 giây không đưa thanh thử hoặc thanh Bead vào, cửa sổ trên máy sẽ tự động đóng lại. Màn hình lại xuất hiện cụm từ “Run test press OK”.



Bước 2: Đưa một trong hai thanh Bead đưa từ từ vào ô cửa sổ trên máy theo hướng mũi tên có ghi trên nhãn của thanh Bead cho tới khi máy nhận được tín hiệu và tự động kéo thanh Bead vào bên trong máy và cửa sổ đóng lại. Tuyệt đối không dùng tay ấn mạnh thanh thử/Bead vào trong sẽ làm hỏng cảm biến của



Màn hình xuất hiện cụm từ “Reading cartridge” (đang đọc thanh thử/thanh Bead), biểu thị máy đang tiến hành các bước đọc và kiểm tra thanh Bead.



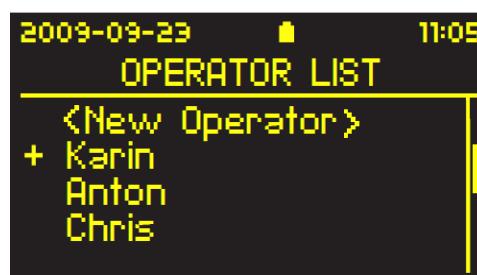
Lưu ý:

- Nếu thanh Bead không đạt tiêu chuẩn, máy sẽ tự động đẩy ra ngoài và màn hình sẽ báo lỗi.

- Nếu thanh Bead đạt tiêu chuẩn, máy sẽ tiến hành quy trình phân tích, trong quá trình phân tích cần phải nhập tên cán bộ xét nghiệm thuật viên mã số mẫu theo bước 3 và 4.

Bước 3: Nhập tên cán bộ xét nghiệm

Màn hình xuất hiện cụm từ “OPERATOR LIST” (DANH SÁCH CÁN BỘ XÉT NGHIỆM) và hiển thị danh sách tên các cán bộ xét nghiệm đã lưu trong máy. Để chuyển chế độ số và chữ trên bàn phím sử dụng phím M (Mode).



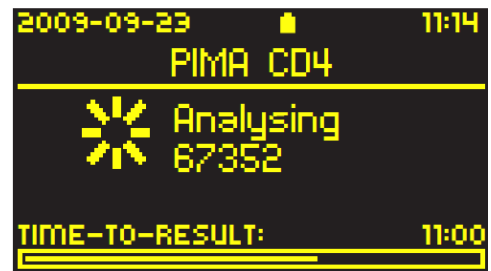
- Nếu tên cán bộ xét nghiệm đã được lưu trong máy, sử dụng phím mũi tên lên , xuống và phím để chọn tên cán bộ xét nghiệm.
- Nếu tên cán bộ xét nghiệm chưa được lưu trong máy cần nhập tên mới bằng cách chọn “<New Operator>” (<Cán bộ xét nghiệm mới>). Nhập tên cán bộ xét nghiệm bằng các phím kí tự, rồi xác nhận bằng phím .

Bước 4: Nhập mã số mẫu xét nghiệm

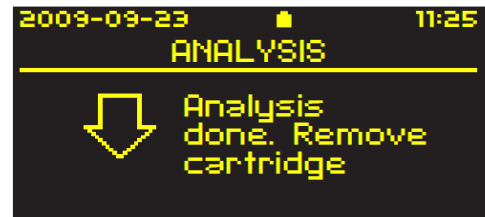
Màn hình hiện lên “ENTER SAMPLE” (NHẬP MÃ SỐ MẪU THỬ). Sử dụng các phím kí tự để nhập các chữ cái và chữ số của dãy mã số mẫu thử, rồi xác nhận bằng phím .



Sau khi hoàn thành xong việc nhập tên cán bộ xét nghiệm và mã số mẫu. Trên màn hình xuất hiện cụm từ “Analysing + một dãy số (ví dụ 67352)” (“Đang phân tích + Mã số mẫu thử”) và thanh biểu tượng dưới đáy màn hình với dòng chữ “TIME - TO - RESUL” cho biết thời gian còn lại của xét nghiệm.

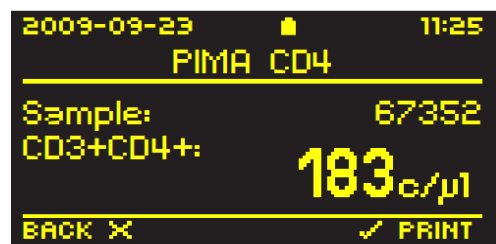


Nếu không có lỗi xảy ra, màn hình hiển thị “Analysis done. Remove cartridge” (Quá trình phân tích đã hoàn tất. Đưa thanh thử ra).

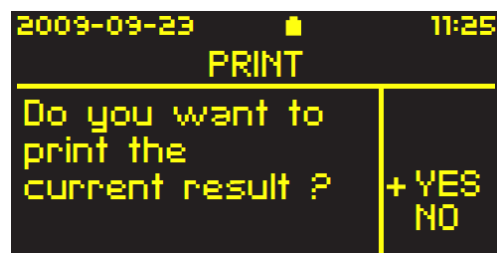


Lưu ý: Sau khi hoàn thành quá trình phân tích, máy sẽ KHÔNG hiển thị kết quả cho tới khi đã nhập tên của cán bộ xét nghiệm và mã số mẫu thử

Bước 5: Rút thanh Bead ra và cất vào hộp đựng thanh kiểm chứng. Màn hình báo cáo kết quả xét nghiệm với mã số mẫu thử và chỉ số kết quả. Sử dụng phím mũi tên lên, xuống để xem các nội dung khác của báo cáo.



Bước 6: Để in báo cáo, nhấn phím , màn hình hiện cụm từ “PRINT” và máy sẽ hỏi “Do you want to print the current result? – Bạn có muốn in kết quả này không?” Dùng các phím mũi tên lên, xuống để xác định có in kết quả hay không.



- Nếu in chọn phím để chọn “YES”.
- Nếu không in nhấn phím để thoát và quay về màn hình kết quả xét nghiệm.

Bước 7: Tiếp tục tiến hành chuẩn máy với thanh Bead còn lại theo các bước từ 1-6.

Bước 8: Phân tích kết quả thanh Bead

- Thiết bị đạt yêu cầu khi thanh Bead cho kết quả như sau:

+ Chỉ số kết quả của 2 thanh Bead nằm trong ngưỡng giới hạn được nhà sản xuất ghi trên nắp hộp chứa bộ thanh Bead.

+ Chỉ số kết quả của 2 thanh Bead giữa các lần xét nghiệm không dao động quá 10%. Kết quả kiểm chứng các lần tiếp theo không chênh lệch quá 10% so với kết quả ghi trên vỏ hộp.

+ Thời gian chạy kiểm chứng bead mất khoảng từ 7 đến 9 phút

- Khi kết quả kiểm chứng không đạt được các yêu cầu trên hoặc máy báo lỗi trong quá trình xét nghiệm, đối chiếu và làm theo phần giải thích mã số và thông báo lỗi của tài liệu này. Nếu lỗi xảy ra trong 3 lần kiểm chứng liên tiếp, cần tiến hành xuất dữ liệu kĩ thuật của máy và liên hệ công ty cung cấp máy.

2.3. Thực hiện xét nghiệm trên mẫu bệnh nhân

Sau khi mẫu máu đã được nạp đầy vào trong thanh Cartridge, đóng chặt thanh Cartridge (tham khảo quy trình lấy mẫu thực hiện xét nghiệm CD4 trên máy PIMA mục V). Cán bộ xét nghiệm ghi mã số của mẫu xét nghiệm trên thanh Cartridge và tiến hành xét nghiệm đếm tế bào CD4 trên thanh Cartridge theo các bước từ 1-6 như quy trình thực hiện thanh Bead mục 2.2.

Lưu ý:

- Tại màn hình phân tích, máy hiện tên xét nghiệm là “PIMA CD4”, thay vì “PIMA BEAD STANDARD”.

- Thời gian tiến hành xét nghiệm một thanh thử là trong vòng 20 phút.

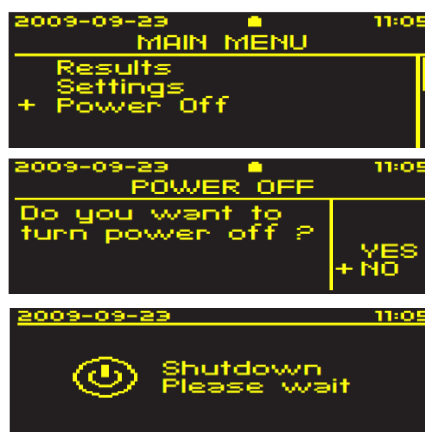
- Sau khi lấy thanh thử khỏi cửa sổ, loại bỏ thanh thử chứa bệnh phẩm theo quy trình phân loại rác thải sinh học nguy hiểm.

2.4. Tắt máy

Đề tắt máy vào cửa sổ MAIN MENU và chọn “Power off – Tắt máy”.

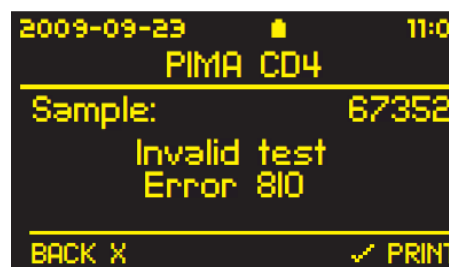
Máy sẽ hỏi “ Do you want to turn power off? – Bạn có muốn tắt máy không?”

Nếu tắt máy chọn “YES” và màn hình sẽ xuất hiện “Shutdown. Please wait- Máy đang tắt- đợi”



3. Sự cố và khắc phục

Trong quá trình phân tích, máy tiến hành một loạt thao tác kiểm tra chất lượng (Quality Control -QC). Khi máy phát hiện có lỗi, xét nghiệm sẽ tự động bị hủy bỏ, thanh thử/thanh Bead bị đẩy ra ngoài và màn hình thông báo lỗi với một mã số lỗi.



Các mã số lỗi thường gặp và các thao tác khắc phục cần tiến hành:

Mã số lỗi	Các thao tác cần tiến hành
002, 003, 004, 005	Khởi động lại máy. Nếu lỗi tiếp tục lặp lại vài lần, liên hệ với kỹ sư của nhà cung cấp máy.
101, 102, 103, 104, 105	Nhấn phím X và tiếp tục.
200	Làm lại xét nghiệm với thanh thử mới. Nếu lỗi tiếp tục lặp lại vài lần, liên hệ với kỹ sư của nhà cung cấp máy
201	Kiểm tra lại màu đỏ trên cửa sổ kiểm soát. Làm lại xét nghiệm với thanh thử mới.
202	Kiểm tra nắp đậy của thanh thử đã đóng khít hay không. Làm lại xét nghiệm với thanh thử mới.
203	Kiểm tra hạn dùng của thanh thử. Kiểm tra ngày tháng của Máy phân tích. Làm lại xét nghiệm với thanh thử còn hạn dùng.
210	Làm lại xét nghiệm với thanh thử mới. Nếu lỗi tiếp tục lặp lại vài lần, liên hệ với kỹ sư của nhà cung cấp máy
300	Liên hệ với kỹ sư của nhà cung cấp máy.
310, 311, 314, 315, 320, 330, 340, 391, 392, 399	Nhấn và giữ phím khởi động sau lưng máy cho tới khi màn hình chuyển màu đen. Sau đó khởi động lại máy. Nếu lỗi tiếp tục lặp lại
810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 910, 920, 930, 940	Làm lại xét nghiệm với thanh thử mới. Nếu lỗi tiếp tục lặp lại vài lần, liên hệ với kỹ sư của nhà cung cấp máy.

Lưu ý: Nếu máy phân tích không phản ứng với bất kỳ thao tác nhấn phím nào trên bàn phím, cần khởi động lại máy bằng cách nhấn và giữ 2 lần phím khởi động sau lưng máy.

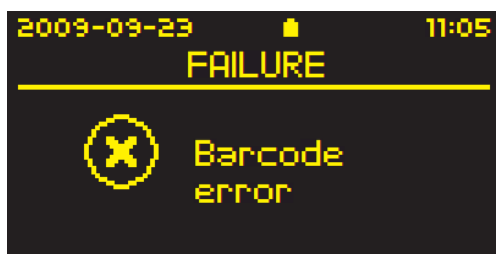
Các thông báo lỗi khác:

Khi tiến hành các thao tác từ các Bảng chọn (Menu), có thể gặp các lỗi như sau.



LỖI: Bộ nhớ máy đầy

- Biểu thị bộ nhớ máy đã đầy và máy không thể làm thêm xét nghiệm nào khác.
- Cần xuất rồi xóa các dữ liệu khỏi máy.
- Lưu ý: máy lưu được 1000 kết quả xét nghiệm.



LỖI: Lỗi mã vạch

- Biểu thị máy không đọc được mã vạch trên thanh thử/thanh bead.
- Cần nhấn , nhập số mã vạch ghi trên bao bì, rồi nhấn để tiếp tục xét nghiệm.
- Hoặc để hủy bỏ xét nghiệm, nhấn phím Back 2 lần, màn hình hiển thị yêu cầu xác nhận hủy bỏ.



LỖI: Mã vạch không phù hợp

- Biểu thị mã vạch của thanh thử không phù hợp với loại xét nghiệm đang tiến hành.
- Lưu ý: chỉ sử dụng thanh thử PIMA CD4 cho xét nghiệm đếm tế bào PIMA CD4 trong máy PIMA.



NHẬP SAI: Cần tên CBXN

- Máy sẽ hiển thị thông báo lỗi này khi tại màn hình nhập tên KTV, người sử dụng nhấn phím trong khi chưa nhập một kí tự nào vào.
- Cần nhấn hoặc rồi tiến hành nhập tên KTV theo đúng hướng dẫn.



NHẬP SAI: Cần Mã số mẫu thử

- Máy sẽ hiển thị thông báo lỗi này khi tại màn hình nhập Mã số mẫu thử, người sử dụng nhấn phím trong khi chưa nhập một kí tự nào vào.

- Cần nhấn hoặc rồi tiến hành nhập Mã số mẫu thử theo đúng hướng dẫn.



NHẬP SAI: Trùng tên KTV

- Máy sẽ hiển thị thông báo lỗi này khi tại màn hình nhập tên KTV mới, người sử dụng nhập một tên đã có sẵn trong danh sách KTV.

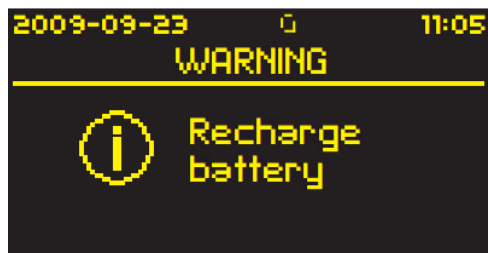
- Cần nhấn hoặc , rồi tiến hành nhập tên khác hoặc chọn tên có sẵn trong danh sách KTV.



LỖI: Xuất dữ liệu thất bại

- Biểu thị lỗi trong quá trình xuất dữ liệu. Nguyên nhân do Máy phân tích hoặc do thiết bị lưu trữ (USB).

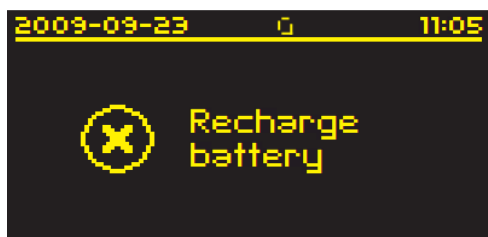
- Nhấn hoặc rồi ngắt kết nối thiết bị lưu trữ. Tiến hành lại quy trình xuất dữ liệu. Thay đổi thiết bị lưu trữ nếu lỗi tiếp tục xảy ra.



CẢNH BÁO: Nên sạc pin

- Biểu thị khi pin yếu, nên sạc pin.

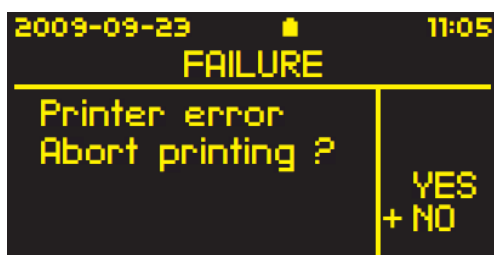
- Cần nhấn hoặc để tiếp tục sử dụng. Nếu đang trong quá trình phân tích, máy sẽ vẫn tiếp tục phân tích. Nên kết nối máy với nguồn điện để sạc pin.



Phải sạc pin

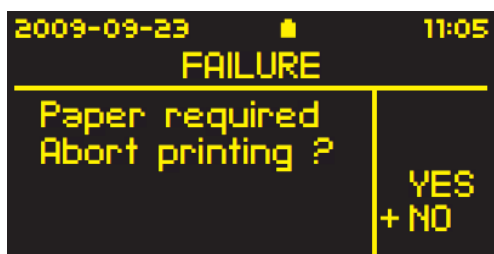
- Biểu thị khi pin quá yếu, cần sạc pin. Máy không thể tiến hành xét nghiệm tiếp theo. (Có thể vẫn tiếp tục sử dụng được các thao tác của bảng chọn chính Main Menu.)

- Cần nhấn hoặc để tiếp tục sử dụng. Cần kết nối máy với nguồn điện để sạc pin.



LỖI: Lỗi máy in. Hủy lệnh in?

- Biểu thị Máy phân tích chưa kết nối với Máy in trước khi chọn lệnh in.
- Cần kết nối Máy in và chọn NO để tiếp tục.
- Hoặc cần chọn YES để hủy bỏ lệnh in.



LỖI: Hết giấy in. Hủy lệnh in?

- Biểu thị Máy in không có đủ giấy để thực hiện lệnh in.
- Cần đưa giấy vào Máy in rồi chọn No để tiếp tục. Máy sẽ in lại báo cáo bị in lỗi khi hết giấy.
- Hoặc cần chọn YES để hủy bỏ lệnh in.



LỰA CHỌN SAI: Chưa chọn xét nghiệm

- Máy sẽ hiển thị thông báo lỗi này khi trong quá trình chọn lệnh in, xuất dữ liệu, xuất dữ liệu rồi xóa, hoặc xóa dữ liệu, người sử dụng đã không nhấn chọn một kết quả xét nghiệm nào cả.
- Cần nhấn , chọn một hoặc nhiều kết quả xét nghiệm, rồi nhấn để máy tiến hành lệnh.



LỖI: Thiết bị lưu trữ đầy

- Biểu thị thiết bị lưu trữ bị đầy lưu lượng trong quá trình xuất dữ liệu.
- Cần nhấn hoặc , rồi ngắt kết nối thiết bị lưu trữ. Kết nối một thiết bị lưu trữ với đủ dung lượng để thao tác lại lệnh xuất dữ liệu.



LỖI: Thiết bị lưu trữ bị ngắt

- Biểu thị thiết bị lưu trữ bị ngắt kết nối trong quá trình xuất dữ liệu.
- Cần nhấn hoặc , rồi kết nối lại thiết bị lưu trữ để thao tác lại lệnh xuất dữ liệu.



- Biểu thị khi Máy phân tích, vì một lí do nào đó, đột ngột hủy bỏ quá trình khởi động máy.
- Cần nhấn và giữ 2 lần nút khởi động để khởi động lại máy.
- Lưu ý: trong vài trường hợp khi pin yếu hơn mức cho phép, máy sẽ yêu cầu nạp lại ngày và giờ.



- Thông báo lỗi này có thể được hiển thị trong một vài trường hợp lỗi không xác định, vào bất kỳ lúc nào trong quá trình máy hoạt động. Tùy thuộc vào nguyên nhân, có thể vẫn sử dụng được các chức năng trong Menu và làm xét nghiệm tiếp theo.
- Cần nhấn để tiếp tục sử dụng máy.
- Hoặc khởi động lại máy nếu máy ngừng hoạt động tạm thời.



- Biểu thị không có đủ lượng bệnh phẩm trong thanh thử. (Đây là lỗi trong quá trình phân tích.)
- Cần nhấn hoặc , màn hình yêu cầu xác nhận hủy bỏ xét nghiệm sẽ hiện ra. Nếu chọn NO để tiếp tục làm xét nghiệm, máy sẽ vẫn tiếp tục làm và sẽ hiển thị lỗi số 201 trong báo cáo kết quả.

VI. Quy trình hướng dẫn lấy máu thực hiện xét nghiệm đếm tế bào T-CD4 trên máy PIMA

Cán bộ y tế đã được đào tạo và phân công thực hiện xét nghiệm đếm tế bào CD4 tiến hành lấy máu theo một trong 2 cách dưới đây:

1. Cách thứ nhất: Lấy giọt máu trực tiếp từ ngón tay

1.1. Chuẩn bị các vật dụng:

Chuẩn bị các vật dụng cần thiết dưới đây và sắp xếp các vật dụng này ở các vị trí phù hợp để thuận tiện cho việc lấy máu trước khi tiến hành lấy máu:

- Bông gạc có thấm cồn 70%;
- Băng gạc y tế đã tiệt trùng;
- Lưỡi chích an toàn;
- Thanh đếm tế bào CD4 (thanh Cartridge) đựng trong túi bạc;
- Băng dính cá nhân;
- Găng tay không bột;
- Thùng đựng chất thải sinh học nguy hiểm.

1.2. Chuẩn bị bệnh nhân:

- Hỏi bệnh nhân để đảm bảo bệnh nhân không sử dụng thuốc chống đông trước khi lấy máu (ví dụ: Warfarin...)

- Để bệnh nhân ngồi hoặc nằm. Bàn tay luôn ở tư thế dốc xuống phía dưới.

- Yêu cầu bệnh nhân làm ấm bàn tay bằng cách nói bệnh nhân xoa hay chà xát hai bàn tay lại với nhau. Không được dùng nước ấm để làm ấm bàn tay vì có thể sẽ dẫn đến các ngón tay bị tột da.

- Yêu cầu bệnh nhân đưa bàn tay ra để kiểm tra các ngón tay của bệnh nhân: Tránh lấy máu ở những ngón tay không ấm, hoặc mẩn đỏ, xanh tím, sưng, lở, hoặc phát ban hoặc có sẹo và những ngón tay đang đeo nhẫn.



1.3. Tiến hành lấy máu:

Bước 1: Đeo găng tay

Đeo găng tay không bột. Trường hợp chỉ có loại găng tay có bột thì sau khi mang găng tay xong phải rửa sạch bột bằng xà phòng và lau khô bằng khăn giấy trước khi lấy mẫu máu.



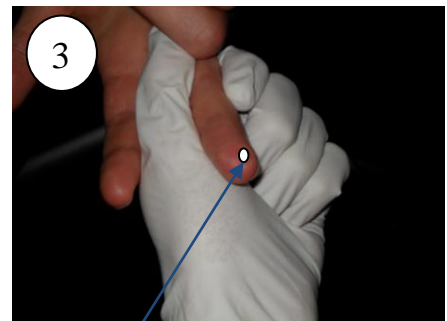
Bước 2: Lấy thanh Cartridge ra khỏi túi

Mở túi giấy bạc và lấy thanh Cartridge ra bằng cách cầm vào nắp màu da cam, không được chạm vào bề mặt trên của thanh Cartridge trong suốt quá trình thực hiện vì sẽ ảnh hưởng đến việc đọc kết quả của máy. Lấy tay kéo nhẹ nắp màu cam lên phía trên và bẻ ngửa ra sau để cho bộ phận nạp mẫu được đưa ra hoàn toàn. Nếu bộ phận nạp mẫu chưa khớp với thanh Cartridge thì chỉnh lại và tránh chạm vào ống mao dẫn.

Lưu ý: Không rút túi bạc cho tới khi hoàn thành xong xét nghiệm vì trong trường hợp mã vạch bị lỗi cần kiểm tra các thông tin ghi bên ngoài túi.

Bước 3: Xác định vị trí chích máu

Cầm tay bệnh nhân theo hướng dẫn như trong hình. Vị trí chích máu tốt nhất là mặt bên (trái hoặc phải) của ngón tay thứ 3 (ngón giữa) hoặc thứ 4 (ngón áp út). Không được chích vào đầu ngón tay hoặc tâm của vân tay. Tránh chích vào bên cạnh của ngón tay nơi có ít mô mềm, có nhiều mạch máu và dây thần kinh vì đây cũng là nơi gần với xương tay.



Vị trí an toàn để chích máu

Bước 4: Sát khuẩn vị trí chích máu

Yêu cầu bệnh nhân duỗi bàn tay xuống phía dưới (các ngón tay phải để thấp hơn cùi trỏ). Dùng miếng bông cồn 70% sát khuẩn vị trí lấy máu và để khô trong 30 giây.



Bước 5: Chích máu

Tháo bỏ nắp của dụng cụ chích máu (lưỡi chích) dùng ngón cái và ngón trỏ giữ chặt phần gốc ngón tay sẽ lấy máu của bệnh nhân. Tránh cầm vào phần đầu ngón tay gần vị trí chích máu, để dòng máu chảy tốt hơn. Ấn lưỡi chích một cách chắc chắn trên ngón tay và chích nhanh, mạnh và dứt khoát để chích máu. Đảm bảo giữ lưỡi chích đúng góc và không làm nghiêng



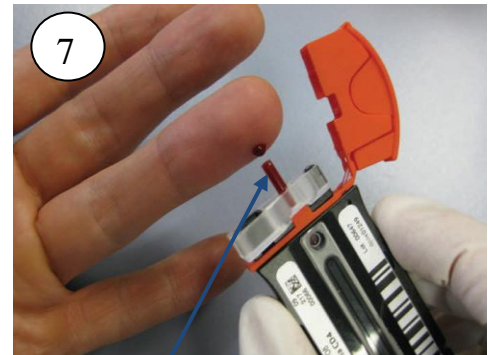
Bước 6: Bỏ giọt máu đầu tiên

Vì giọt máu đầu tiên thường chứa dịch tổ chức, tế bào kẽ mà không đủ lượng tế bào máu cho xét nghiệm vì vậy cần bỏ giọt máu đầu tiên bằng cách lau nhẹ nhàng bằng một miếng gạc đã tiệt trùng (có trong bộ lấy máu) hoặc bông sạch không có cồn.

Bước 7: Lấy giọt máu lớn hơn

Đợi cho đến khi máu chảy ra hình thành một giọt máu lớn khác tại vị trí chích máu thì đưa thanh Cartridge vào và giữ một góc nghiêng 45° để lấy 25µl máu vào bộ phận nạp mẫu.

Để bộ phận nạp mẫu tiếp xúc trực tiếp với giọt máu, tránh tiếp xúc trực tiếp vào vị trí chích vì điều này có gây bịt kín ống mao dẫn và gây trở ngại cho quá trình lấy mẫu. Ngưng nạp mẫu khi ống mao dẫn của bộ phận nhận mẫu đã đầy và lấy ra khỏi ngón tay bệnh nhân. Ấn miếng gạc đã tiệt trùng vào vị trí chích máu

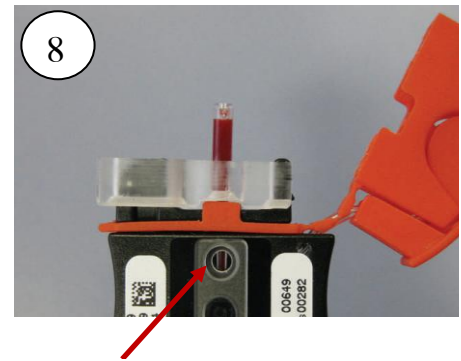


Bộ phận nạp mẫu máu

Lưu ý: Để giúp cho máu chảy, có thể tạo áp lực bằng cách xoa nhẹ từ bàn tay đến phần gốc ngón tay chích máu. Đảm bảo máu nhỏ đều đặn mà không cần phải nặn hoặc tạo áp lực trực tiếp đến vị trí đã chích. Không được chạm vào bề mặt trên của thanh Cartridge trong suốt quá trình thực hiện vì sẽ ảnh hưởng đến việc đọc kết quả.

Bước 8: Kiểm tra lượng mẫu nạp vào thanh Cartridge

Kiểm tra lượng máu nạp vào thanh Cartridge có đủ hay không bằng cách cầm thanh Cartridge theo hướng thẳng đứng và đưa lên ngang tầm mắt. Quan sát bằng mắt vào cửa sổ kiểm soát hình tròn trên thanh cartridge và thấy ống mao dẫn đã đầy máu và chuyển sang màu đỏ biểu thị đã nạp đủ thể tích máu.

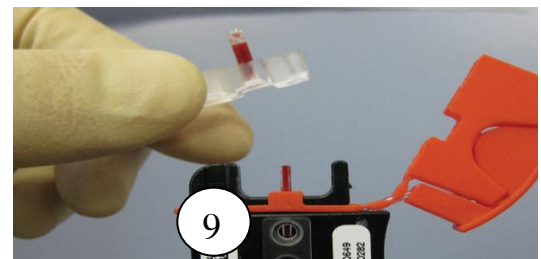


Cửa sổ kiểm soát việc nạp mẫu

Lưu ý: Không được lấy bộ phận nạp mẫu ra cho đến khi thấy cửa sổ kiểm soát trên thanh cartridge chứa đầy mẫu, phải mất vài giây trước khi ống mao dẫn trong cửa quan sát bắt đầu nạp mẫu. Nếu mất hơn 15 giây, giữ chặt kẹp ghim của bộ phận nạp mẫu bằng ngón cái và ngón trỏ, rồi nhấc bộ phận nhận mẫu lên trên khoảng 1 đến 2 milimet để giải quyết sự cố.

Bước 9: Lấy bộ phận nạp mẫu ra khỏi thanh Cartridge.

Giữ phần cuối của bộ phận nạp mẫu bằng ngón cái và ngón trỏ, nhấc bộ phận nạp mẫu ra khỏi cartridge theo hướng lên trên và thả bỏ vào hộp đựng các vật sắc nhọn theo đúng quy định.



Lưu ý: Không lấy bộ phận nạp mẫu ra khỏi thanh cartridge trước khi cửa sổ kiểm soát chuyển sang màu đỏ.

Bước 10: Đóng nắp thanh Cartridge

Dùng tay đóng kín nắp màu cam lại.

Lưu ý: Thanh Cartridge sau khi đã nạp đầy máu cần được gắn ngay vào máy Pima để phân tích (tốt nhất là gắn vào trong vòng 1 phút và không được quá 5 phút)



Bước 11: Băng vết chích lại

Dùng băng dính cá nhân băng vị trí bị chích máu lại cho bệnh nhân.

2. Cách thứ 2: Lấy máu từ máu tĩnh mạch cho vào ống có chất chống đông bằng EDTA

Sau khi đã lấy được máu tĩnh mạch vào ống có chứa EDTA, đảo ngược ống máu 8-10 lần để máu trộn đều với chất chống đông EDTA;

Chỉnh dung tích của pipette ở mức 25 μ l. Dùng pipette hút 25 μ l máu từ ống máu.

Tiến hành nhỏ máu từ pipette vào bộ phận nạp mẫu trên thanh Cartridge như sau:

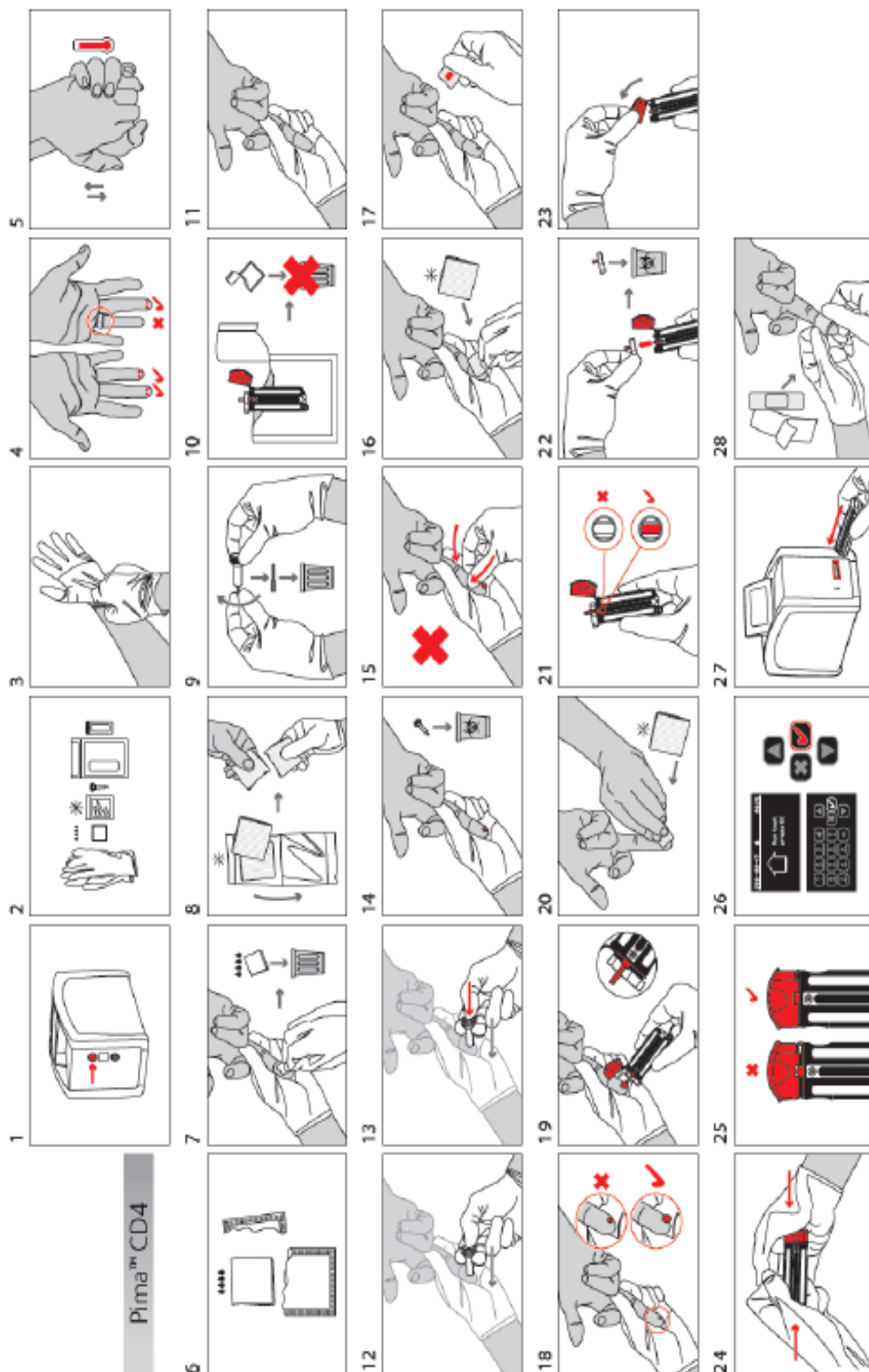
+ Đẻ đầu côn của pipette chéch với thành bộ phận nạp mẫu một góc nghiêng khoảng 15° để tạo điều kiện cho dòng máu đi vào dễ dàng.

+ Nhấn pipet từ từ cho máu chảy vào bộ phận nạp mẫu cho đến khi máu nạp đầy thì nhắc đầu côn ra.

Thực hiện theo các bước từ 8-10 như cách 1.

Lưu ý: Trong trường hợp mẫu chưa được nhỏ vào bộ phận nạp mẫu ngay sau khi lấy mẫu, có thể giữ mẫu máu ở nhiệt độ phòng ($18-25^\circ\text{C}$) vòng trong 24 giờ sau khi lấy máu.

Quy trình tóm tắt các bước lấy máu và thực hiện xét nghiệm đếm tế bào CD4 trên máy Pima



ĐÁP ÁN

Bài 1:

1. a 2. c 3. b 4. b 5. a 6. b 7. d 8. a

Bài 2

1. c 2. d 3. d 4. b 5. e 6. c 7. c 8. b 9. a 10. a

Bài 3

Câu 1:

+ Giới tính, chủng tộc, tuổi, căng thẳng tâm lý, chu kỳ kinh nguyệt ảnh hưởng đến số lượng tế bào CD4.

+ Số lượng tế bào CD4 thay đổi theo thời gian trong ngày (thấp nhất lúc 12:30, cao nhất lúc 20:30). Do vậy, việc lấy máu xét nghiệm nên được thực hiện vào cùng thời điểm trong ngày để tiện việc đánh giá (thí dụ: lấy máu xét nghiệm tế bào T-CD4 lần thứ nhất vào buổi sáng thì lần thứ hai cũng phải lấy máu vào buổi sáng).

+ Mang thai làm loãng máu dẫn đến suy giảm một lượng ít tế bào T-CD4 nhưng không làm giảm phần trăm tế bào T-CD4.

+ Một số loại thuốc làm giảm số lượng tế bào T-CD4 (thí dụ như corticosteroid, PEG-IFN, IFN và thuốc hóa trị liệu ung thư).

+ Một số bệnh lý làm tăng số lượng tế bào T-CD4 (thí dụ: cúm, nhiễm HTLV-I...).

Câu 2:

- Tập huấn cho cán bộ phòng xét nghiệm hoặc của bất kỳ cơ sở y tế nào về việc đảm bảo chất lượng mẫu để tránh lấy nhầm mẫu, để mẫu bị tan huyết, bị vón cục, gửi mẫu muộn và để mẫu tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng và nhiệt độ cao. Cụ thể:

- Tại thời điểm lấy mẫu: xác định đúng bệnh nhân bằng cách “hỏi” và kiểm tra đối chiếu các thông tin của bệnh nhân được ghi trong phiếu yêu cầu xét nghiệm.

- Lấy mẫu:

+ Tuyệt đối tuân thủ qui trình lấy máu.

+ Ghi nhãn mẫu.

+ Thông tin trên mẫu phải đúng với thông tin trên phiếu yêu xét nghiệm.

+ Hủy và gây mất số lượng bạch cầu.

Câu 3:

- Mẫu bị tan huyết: **D**

- Dưỡng chấp: **C**

- Mẫu bị vàng: **B**

- Mẫu bình thường : **A**

Câu 4:

Lỗi	Giải pháp
Không đúng thông tin xác định bệnh nhân / Sai nhãn	Không dán nhãn trước các ống lấy máu
Không sử dụng đúng chất chống đông/ống lấy máu	Luôn sử dụng chất chống đông là EDTA
Tỷ lệ máu so với chất chống đông không đúng	Lấy đúng thể tích máu mà nhà sản xuất yêu cầu
Mẫu bị đông vón một phần	Trộn mẫu 8-10 lần
Tan huyết	Thực hiện đúng kỹ thuật lấy máu
Máu bị pha loãng	Luôn lấy mẫu ở tay đối diện tiêm truyền IV hoặc dưới chỗ tiêm truyền IV

Câu 5 :

Các ống đựng mẫu không có nhãn.

Câu 6:

Các tiêu chuẩn loại bỏ mẫu như sau:

- Số xác định bệnh phẩm không phù hợp
- Thể tích mẫu không đủ
- Pha loãng mẫu bằng dịch
- Ống lấy mẫu không phù hợp
- Tan huyết
- Điều kiện vận chuyển không đúng
- Mẫu bị đông vón

Câu 7. d

Câu 8. a

Bài 4. 1. c 2. a 3. b 4. c 5. b 6. b 7. c 8. c

Bài 5. 1. c 2. b 3. c 4. a 5. b 6. a 7. b 8. d

Bài 6. 1. d 2. b 3. c 4. a 5. c 6. b 7. c 8. d

Bài 7. 1. e 2. b 3. c

Câu 4

- Đánh giá tình trạng an ninh và an toàn vi sinh vật phòng thí nghiệm của các phòng thí nghiệm y - sinh học.
- Đảm bảo tất cả nhân viên đều am hiểu và tuân thủ thực hành tốt các kiến thức an toàn sinh học.
- Phát hiện những vấn đề còn tồn tại để luôn cải thiện can thiệp hoặc phòng ngừa an toàn hiệu quả.

Câu 5

5.1 : ATSH cấp 2

5.2 : ATSH cấp 3

5.3 : ATSH cấp 4

5.4 : ATSH cấp 1

Câu 6 : e

Câu 7: e (phải dùng ống tube có nắp)

Câu 8 : c

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. An toàn sinh học phòng xét nghiệm NTT/NIHE.
2. Basic QC Practices 3rd Edition, James O. Westgard
3. BD Diagnostic GLP protocols for FACSCount and FACSCalibur.
4. Bureau of HIV/AIDS, STD and TB Population and Public Health Branch Health Canada Ottawa, Ontario, Canada.
5. Guidelines for Performing Single-Platform Absolute CD4 + T-Cell Determinations with CD45 Gating for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus.
6. Laboratory Guidelines for enumerating CD4 T Lymphocytes in the context of HIV/AIDS, World Health Organization, 2009, pp 48-53
7. Office of the Director and 3Division of AIDS, STD, and TB Laboratory Research National Center for Infectious Diseases, CDC.
8. Partec CyFlow SL-3 procedures.
9. Principal and application of flow cytometry. Roger S. Riley, Micheal Idowu – Medical College of Virginia.
10. QA/QC of CD4 and Viral Load Assays in the Resource-Limited Setting. Forum for Colaborative HIV Research Department of Health Policy. School of Public Health and Health Services. The George Washington University. October 30, 2003. Warsaw, Poland.
11. Quy trình hoạt động của máy Guava EASYCD4[®] - Milipore.
12. Reliability of CD4 Quantitation in Human Immunodeficiency Virus-Positive Children: Implications for Definition of Immunologic. Response to Highly Active Antiretroviral Therapy. Vincent J. Carey, Savita Pahwa, and Adriana Weinberg.Center for Biostatistics in AIDS Research, Harvard University School of Public Health, Channing Laboratory. CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, May 2005, p. 640 - 643, Vol. 12, No. 5.
13. Revised Guidelines for Performing CD4+ T-Cell Determinations in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). 1997.
14. WHO Guideline for HIV diagnosis and ARV monitoring. 2004.
15. Unitaid Technical report – 2011.
16. Luật Phòng chống các bệnh truyền nhiễm số 03/2007/QH12 ngày 21/11/2007.

17. Luật Phòng, chống nhiễm vi rút gây ra hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người (HIV/AIDS) ngày 29/6/2006.
18. Nghị định số 92/2010/NĐ-CP ngày 30/8/2010 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành Luật Phòng, chống bệnh truyền nhiễm về bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm.
19. Nghị định 69/2011/NĐ-CP ngày 08/8/2011 quy định xử phạt vi phạm hành chính về y tế dự phòng, môi trường y tế và phòng, chống HIV/AIDS.
20. Thông tư số 09/2011/TT BNV ngày 03/6/2012 của Bộ Nội Vụ về “Quy định về thời hạn bảo quản hồ sơ, tài liệu hình ảnh phổ biến trong hoạt động của các cơ quan tổ chức.
21. Thông tư số 43/2011/TT-BYT ngày 05/12/2011 của Bộ Y tế về quy định chế độ quản lý mẫu bệnh phẩm bệnh truyền nhiễm.
22. Quyết định số 3781/QĐ-BYT ngày 04/10/2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế về Quản lý và sử dụng máy đếm tế bào CD4.
23. Xét nghiệm đếm tế bào TCD4 trong điều trị HIV, Cục Phòng, chống HIV/AIDS, Nhà xuất bản Y học, 2009.
24. Quyết định số 43/2007/QĐ-BYT ngày 30/11/2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc Quy chế quản lý chất thải y tế.
25. Quyết định số 4696/QĐ-BYT ngày 27/11/2008 của Bộ trưởng Bộ Y tế về “Chuẩn quốc gia về TTYTDP tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương”.
26. <http://www.alere.co.uk/sexual-health/alere-pimatm-cd4-analyser-254/product-listing.htm>