

QUY TRÌNH
XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN NHIỀU LOẠI DỊ NGUYÊN
(Test phát hiện 54 dị nguyên)

I. NGUYÊN LÝ

Bộ kit xét nghiệm bán định lượng kháng thể IgE đối với dị nguyên hô hấp và thức ăn trong huyết thanh hoặc huyết tương bệnh nhân để chẩn đoán các phản ứng dị ứng có thể gây bệnh lý đường tiêu hóa, viêm kết mạc hay các bệnh lý viêm mũi, hen.

Kit xét nghiệm bao gồm thanh gắn 54 dị nguyên. Thanh gắn dị nguyên được làm ẩm và sau đó ủ bước đầu tiên với huyết thanh bệnh nhân. Nếu mẫu huyết thanh có các kháng thể đặc hiệu IgE, chúng sẽ được gắn vào các kháng nguyên trên thanh gắn dị nguyên. Để phát hiện liên kết kháng nguyên kháng thể trên, cần tiến hành ủ lần 2 với một enzyme kháng thể đơn dòng được gắn nhãn xác định kháng thể IgE (enzyme conjugate) sau đó đo màu phản ứng.

II. CHUẨN BỊ

1. Cán bộ thực hiện: 01 Bác sỹ hoặc 01 cán bộ đại học và 01 kỹ thuật viên chuyên ngành Hóa sinh.

2. Phương tiện, hóa chất:

- Phương tiện: Máy ủ EUROBlotMaster, Máy ly tâm; Tủ lạnh để bảo quản hóa chất, chất hiệu chuẩn, QC và mẫu bệnh phẩm; Pipet các loại; Ống nghiệm, giá đựng ống nghiệm

- Hóa chất:

Mô tả	Quy cách đóng gói	Biểu tượng
Thanh gắn các dị nguyên: f1, f75, f3, f24, f40, f308, f4, f5, f6, f7, f9, f14, f292, f79, f13, f17 f20, f2, f76, f77, f78, f105, f218, f25, f32, f33, f44, f49, f72, f26, f27, f83, f155, f45, u85, d1, d2, d201, e1, e2, e85, m1, m2, m3, m5, m6, g2, w8, i1, i3, i70, i71, i100, CCD	16 x 1	STRIPS
Enzyme conjugate Alkaline phosphatase-labelled anti-human IgE (chuột). Sẵn sàng sử dụng	1 x 20 mL	CONJUGATE
Universal buffer Đậm đặc gấp 10 lần	1 x 100 mL	BUFFER 10x
Substrate solution Nitroblue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate. (NBT/BCIP), sẵn sàng sử dụng	1 x 30 ml	SUBSTRATE
Khay ủ , thể tích đã giảm (400 µL)	2 x 10 channels	TRAY
Khay ủ nhựa	1 sheet	

Các hóa chất chưa mở nắp để đến hạn sử dụng ghi trên bao bì trong điều kiện nhiệt độ từ +2°C tới +8°C. Sau khi mở nắp, các hóa chất sử dụng được trong 12 tháng, các hóa chất sau khi mở nắp phải bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ +2°C tới +8°C và tránh nhiễm bẩn.

Các dị nguyên: thanh gấn dị nguyên theo thứ tự như sau:

Vị trí	Mã dị nguyên	Tên dị nguyên
1	f1	Lòng trắng trứng
2	f75	Lòng đỏ trứng
3	f3	Cá tuyết
4	f24	Tôm
5	f40	Cá ngừ
6	f308	Cá mòi/cá trích
7	f4	Bột mì
8	f5	Bột lúa mạch đen
9	f6	Bột lúa mạch
10	f7	Bột yến mạch
11	f9	Bột gạo
12	f14	Đậu nành
13	f292	Ngô
14	f79	Gluten
15	f13	Đậu tương
16	f17	Cây phi
17	f20	Quả hạnh nhân
18	f2	Sữa bò
19	f76	nBos d4 - Alpha-lactalbumin (sữa bò)
20	f77	nBos d5 - Beta-lactoglobulin (sữa bò)
21	f78	nBos d8 - Casein (sữa bò)
22	f105	Sô cô la
23	f218	Sữa dê
24	f25	Cà chua
25	f32	Quả chanh
26	f33	Quả cam
27	f44	Dâu tây
28	f49	Quả táo
29	f72	Quả dứa
30	f26	Thịt lợn
31	f27	Thịt bò
32	f83	Thịt gà
33	f155	Men bia
34	f45	Men làm bánh

Vị trí	Mã dị nguyên	Tên dị nguyên
35	u85	Nhựa latex
36	d1	Dermatophagoides pter. (ký sinh trùng da)
37	d2	Dermatophagoides farinae (ký sinh trùng da)
38	d201	Blomia nhiệt đới hóa
39	e1	Mèo
40	e2	Chó
41	e85	Lông gà
42	m1	Penicillium notatum
43	m2	Cladosporium herbarum
44	m3	Aspergillus fumigatus
45	m5	Candida albicans
46	m6	Alternaria alternata
47	g2	Cỏ Bermuda
48	w8	Bò công anh
49	i1	Nọc ong mật
50	i3	Nọc ong bắp cày
51	i70	Kiến lửa
52	i71	Muỗi
53	i100	Con gián
54	CCD	Chỉ thị CCD
55	Ind	Dải chỉ thị

3. Người bệnh: Cần giải thích mục đích của xét nghiệm để bệnh nhân và người nhà bệnh hiểu, từ đó có thể hợp tác trong quá trình lấy máu.

4. Phiếu xét nghiệm: có đầy đủ thông tin về bệnh nhân bao gồm họ tên, tuổi, khoa phòng, chẩn đoán, tình trạng mẫu, tên BS chỉ định, ngày giờ chỉ định, ngày giờ lấy mẫu, các loại thuốc đã sử dụng (nếu có)...

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm và xử lý mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm: Huyết thanh hoặc huyết tương chống đông bằng EDTA, heparin, citrate:
- + Lấy 2 mL máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông hay ống có chất chống đông là Li-/Na-heparin, Na-/K3-EDTA, hay citrate. Máu không vỡ hồng cầu.
- + Bệnh phẩm được nhận từ các khoa lâm sàng và bộ phận lấy mẫu phòng khám. Nhân viên nhận mẫu lấy thông tin bệnh nhân từ phần mềm quản lý Bệnh viện, in và dán barcode vào ống

bệnh phẩm, sau đó cho ly tâm ngay 4000 vòng trong 5 phút tách lấy huyết thanh hoặc huyết tương.

- Bệnh phẩm ổn định ở nhiệt độ từ +2°C tới +8°C trong 14 ngày. Bệnh phẩm đã pha loãng ổn định trong ngày làm việc.

2. Tiến hành kỹ thuật

1.1. Chuẩn bị hóa chất:

- Tất cả hóa chất phải để ở nhiệt độ phòng (+18°C tới +25°C) khoảng 30 phút trước khi xét nghiệm.

- **Thanh gắn dị nguyên:** sẵn sàng sử dụng. Mở và để thanh gắn dị nguyên ở nhiệt độ phòng Open (+18°C to +25°C) để tránh sự cô đọng. Sau khi lấy thanh gắn dị nguyên, hộp kit còn lại cần được đóng lại và bảo quản ở nhiệt độ từ +2°C tới +8°C.

- **Enzyme conjugate:** sẵn sàng sử dụng. Lắc đều trước khi sử dụng

- **Universal buffer:** được làm đậm đặc gấp 10 lần. Lắc đều trước khi sử dụng, sử dụng pipet để pha loãng theo tỷ lệ 1:10 với nước cất. Ủ mỗi thanh gắn dị nguyên với 2.0 ml buffer đậm đặc được pha loãng với 18.0 ml nước cất. Dịch buffer đã được pha loãng có thể sử dụng trong ngày.

- **Dịch Chromogen/Substrate:** sẵn sàng sử dụng. Đóng nắp lọ lại ngay sau khi sử dụng vì chứa các thành phần nhạy cảm với ánh sáng

2.2. Các bước tiến hành

2.2.1. Bước 1: Ủ hóa chất: Đặt các thanh gắn dị nguyên vào vị trí trong khay ủ. Đổ đầy mỗi các kênh 1.0 mL dịch Buffer và ủ trong **5 phút**. Sau đó hút bỏ tất cả các dịch.

2.2.2. Bước 2:

• Ủ huyết thanh

- **Bằng tay:**

+ **Cách 1** (thời gian tối ưu hóa): đổ đầy mỗi kênh **400 µL** (khay đã được giảm thể tích) **huyết thanh mẫu** và ủ trong **60 phút** tại nhiệt độ phòng (+18 C tới +25 C) trên máy lắc.

+ **Cách 2** (thể tích/thời gian tối ưu hóa): đổ đầy mỗi kênh với **425 µL** dịch **huyết thanh đã pha loãng** (175 µL huyết thanh / huyết tương + 250µL dịch buffer) và ủ trong **2 giờ** tại nhiệt độ phòng trên máy lắc

+ **Cách 3** (thể tích tối ưu hóa): ủ **1.1 mL** của **mẫu đã được pha loãng qua đệm 1:11 (12 - 24 giờ)** trên máy lắc ở nhiệt độ phòng. (Che khay ủ để tránh bay hơi).

- **Tự động:**

+ **Cách b** (thể tích/thời gian tối ưu hóa): thể tích ủ phải được tăng lên 510 µL (210 µL mẫu + 300 µL dịch Buffer)

+ **Cách c** (thể tích tối ưu hóa): với mẫu đã được pha loãng để qua đêm với tỷ lệ 1:11, thể tích ủ phải tăng lên 1.65 mL (1.5 mL dịch Buffer cộng 150 µl mẫu),

Lưu ý: không tương thích với khay đã được giảm thể tích, phải sử dụng các khay 1 mL.

• **Rửa:**

- **Bằng tay:** Hút bỏ dịch trong các kênh và rửa trong **3 lần, mỗi lần 5 phút** bằng 1.0 mL dịch Buffer trên máy lắc

- **Tự động:** Cách c với mẫu đã pha loãng 1:11 để qua đêm, phải dùng 1800 µL dịch để rửa

- **Lưu ý:** không tương thích với khay đã được giảm thể tích, phải sử dụng các khay 1 mL.

2.2.3. Bước 3:

• **Ủ dịch Conjugate:** Hút 1.0 ml dịch enzyme conjugate (alkaline phosphatase conjugated anti-human IgE, monoclonal) vào mỗi kênh và ủ trong **60 phút** tại nhiệt độ phòng trên máy lắc.

• **Rửa:** Hút dịch trong các kênh sau đó rửa như mô tả phía trên.

2.2.4. Bước 4:

• **Ủ dịch Substrate:** Hút 1.0 ml dịch chromogen/substrate vào mỗi kênh. Ủ trong **10 phút** tại nhiệt độ phòng trên máy ủ.

• **Rửa:** Hút và rửa mỗi kênh **3 lần, mỗi lần 1 phút** bằng nước cất.

- **Lưu ý:** Nếu tự động ủ bằng máy EUROBlotMaster thì chọn chương trình **Euro11 Allerg EL60** (Cách a) hoặc **Euro08 Allerg 2h** (Cách b) hay **Euro12 Allerg 16h** (Cách c).

2.2.5. Bước 5: Đánh giá:

- Đặt thanh gắn dị nguyên đã ủ vào máy quét theo quy trình, làm khô và đánh giá.

- Cách đánh giá kết quả theo độ tập trung:

Loại	Độ tập trung [kU/L]	Kết quả
0	< 0.35 kU/L	Không phát hiện kháng thể đặc hiệu.
1	0.35 kU/L ≤ IgE < 0.7 kU/L	Nồng độ kháng thể rất thấp, thường không có triệu chứng lâm sàng. Có độ nhạy cảm
2	0.7 kU/L ≤ IgE < 3.5 kU/L	Nồng độ kháng thể thấp, tồn tại nhạy cảm, thường có các triệu chứng lâm sàng ở các loại cao hơn
3	3.5 kU/L ≤ IgE < 17.5 kU/L	Có kháng thể, thường có triệu chứng lâm sàng.
4	17.5 kU/L ≤ IgE < 50.0 kU/L	Nồng độ kháng thể cao, hầu hết có triệu chứng lâm sàng.
5	50.0 kU/L ≤ IgE < 100.0 kU/L	Nồng độ kháng thể rất cao.

6	≥ 100 kU/L	Nồng độ kháng thể cực cao.
---	-----------------	----------------------------

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Các kết quả âm tính bình thường chỉ ra rằng một người có thể không có dị ứng thực sự với chất gây dị ứng đó.

- Kết quả dương tính ở những mức độ khác nhau với một dị nguyên nào đó thường chỉ ra là có thể dị ứng với dị nguyên đó, khi đó cần kết hợp với bác sỹ lâm sàng để đưa đến kết luận cho bệnh nhân.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- **Các phản ứng chéo:** vì cấu trúc tương đồng ở các dị nguyên, ví dụ như tương đồng về thành phần hóa học hay các quan hệ thực vật có thể xảy ra các phản ứng chéo. Cách xử trí: xem xét dải chỉ thị