

QUY TRÌNH

22.369 QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM ANA 17 PROFILE TEST (SÀNG LỌC VÀ ĐỊNH DANH ĐỒNG THỜI 17 TYP KHÁNG THỂ KHÁNG NHÂN BẰNG THANH SẮC KÝ MIỄN DỊCH)

I. NGUYÊN LÝ

ANA 17 profile test (sàng lọc và định danh đồng thời 17 typ kháng thể kháng nhân bằng thanh sắc ký miễn dịch) được chỉ định trong các trường hợp nghi ngờ đến bệnh tự miễn.

Kháng nguyên (KN) được gắn sẵn trên màng của strip. Các KN kết hợp với kháng thể (KT) đặc hiệu (nếu có) trong huyết thanh người bệnh tạo nên phức hợp KN - KT khi ủ. Sau khi rửa sạch, phức hợp này sẽ được gắn tiếp với KT kháng globulin miễn dịch người (anti IgG) đã kết hợp sẵn enzym peroxidase. Sau khi rửa, lượng enzym gắn với phức hợp này được giữ lại trong giếng. Khi cho cơ chất, enzym sẽ xúc tác tạo phản ứng tạo màu xanh. Sau đó ngừng phản ứng tạo màu bằng nước cất, đọc kết quả.

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

2.1. Phương tiện: Máy ly tâm ống máu; - Pipet và đầu côn dùng được cho 10 μ l, 300 μ l, 700 μ l, 1000 μ l; - Pipet nh a; - Găng tay.

2.2. Hóa chất:

- Dung dịch Wash Buffer 20X (pha thành dung dịch 1X bằng nước cất);
- Dung dịch đệm mẫu (10ml Wash Buffer 1X + 1 lọ Blocking Reagent);
- Dung dịch cộng hợp (Conjugates);
- Cơ chất tạo màu (TMB substrate); - 24 strips; - 24 rãnh ủ; - Bảng tham chiếu; - Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

3. Người bệnh: Người bệnh được giải thích và tư vấn trước khi thực hiện XN, tốt nhất là nhịn ăn sáng và lấy máu vào buổi sáng.

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)...

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm và xử trí bệnh phẩm:

- Mẫu bệnh phẩm: Mẫu dùng là huyết thanh

- Lấy 2 mL máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống. 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 10 phút tách lấy huyết thanh.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng. Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu thêm 1 lần nữa để loại các thành phần đó trước khi xét nghiệm.
- Mẫu huyết thanh bảo quản ở nhiệt độ 2°C đến 8°C có thể dùng làm xét nghiệm trong vòng 7 ngày. Nếu muốn để lâu hơn mới xét nghiệm cần phải bảo quản ở tủ lạnh sâu ($\leq -20^{\circ}\text{C}$). Tuy nhiên với mẫu bảo quản lạnh sau cần tránh rã đông-tan nhiều lần.

2. Tiến hành kỹ thuật:

- Bước 1. Đặt strip (Strip cho người bệnh, Strip chứng âm, Strip chứng dương) vào rãnh ủ.
- Bước 2. Cho 700 μL Wash buffer 1X và 300 μL Sample buffer vào rãnh ủ. Làm ẩm strip với dung dịch và ủ trong vòng 5 phút, lắc đều.
- Bước 3. Hút 10 μL mẫu huyết thanh vào rãnh ủ, trộn đều. Ủ 30 phút ở 20-32°C, lắc đều (5 phút lắc 1 lần). Hút bỏ hoàn toàn dung dịch trong rãnh.
- Bước 4. Rửa 1 lần (1x 1,5mL Wash buffer 1X) trong vòng 5 phút, lắc đều. Hút bỏ hoàn toàn dung dịch rửa. Lặp lại bước rửa 2 lần.
- Bước 5. Hút 700 μL Wash buffer 1X và 300 μL Conjugate vào rãnh ủ, lắc đều. Ủ 30 phút ở 20-32°C, lắc đều (5 phút lắc 1 lần). Hút bỏ hoàn toàn dung dịch trong rãnh.
- Bước 6. Rửa 1 lần (1x 1,5ml Wash buffer 1X) trong vòng 5 phút, lắc đều. Hút bỏ hoàn toàn dung dịch rửa. Lặp lại bước rửa 2 lần.
- Bước 7. Hút 700 μL nước cất và 300 μL cơ chất hiện màu vào rãnh ủ, lắc đều. Ủ 15 phút ở 20-32°C, lắc đều (5 phút lắc 1 lần), tránh ánh sáng. Hút bỏ hoàn toàn dung dịch trong rãnh.
- Bước 8. Hút 2 mL dung dịch nước cất vào rãnh ủ. Ủ 1 phút, lắc đều. Hút bỏ hoàn toàn dung dịch trong rãnh. Lặp lại bước này một lần nữa.
- Bước 9. Bỏ strip ra khỏi rãnh ủ. Làm khô strip bằng giấy lọc.
- Bước 10. Phân tích kết quả trong vòng 24h.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Kết quả của test có thể coi là hợp lệ, nếu:
 - + Functional control có thể nhận thấy được;
 - + Cut-off control có thể nhận thấy được;

+ Cường độ màu sắc của cut-off control yếu hơn so với Functional control;

+ Chứng âm tính, chứng dương tính.

- Đặt strip lên bảng tham chiếu sao cho băng tại vị trí của Functional control, Cut-off control trên strip khớp với băng trên bảng tham chiếu.

- So sánh cường độ màu sắc của các băng với cường độ màu của cut-off control:

+ Nếu cường độ màu sắc mạnh hơn: kết quả xét nghiệm là dương tính;

+ Nếu cường độ màu sắc là yếu hơn: xét nghiệm là âm tính.

VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên người bệnh trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất, máu bị đông. Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại thông tin trên giấy chỉ định và trên ống nghiệm, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Chứng dương âm tính hoặc chứng âm dương tính: Nếu xảy ra hiện tượng này đều không dùng được kết quả của lần xét nghiệm này. Nguyên nhân có thể do hóa chất không đảm bảo chất lượng, do không thực hiện đủ và đúng các bước trong quy trình xét nghiệm, nhiệt độ phản ứng không phù hợp, thực hiện bước rửa kém hiệu quả. Để strip khô trong bước ủ, để ngón tay chạm vào strip, nhỏ hóa chất trực tiếp vào strip. Xử trí: làm lại xét nghiệm, kiểm tra chỉ dùng hóa chất c n hạn sử dụng và được bảo quản đúng điều kiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (20-32°C).