



**HƯỚNG DẪN
QUY TRÌNH CHUYÊN MÔN KỸ THUẬT VỀ
DI TRUYỀN - SINH HỌC PHÂN TỬ
(TẬP 1)**

(Ban hành kèm theo Quyết định số /QĐ-BYT ngày tháng năm 2025
của Bộ trưởng Bộ Y tế)

Hà Nội, 2025

Chỉ đạo biên soạn, thẩm định	
GS.TS. Trần Văn Thuấn	Thứ trưởng Bộ Y tế
Chủ biên	
PGS.TS. Nguyễn Hà Thanh	Viện trưởng Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
TS.BS. Hà Anh Đức	Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
Tham gia biên soạn, thẩm định	
PGS.TS. Trần Đức Phấn	Chủ tịch hội Di truyền Y học Việt Nam
TS.BS. Dương Huy Lương	Phó Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
TS.BS. Vương Ánh Dương	Phó Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
GS.TS. Phạm Quang Vinh	Nguyên Phó Viện trưởng Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
PGS.TS. Phan Thị Xinh	Trưởng khoa Di truyền học phân tử, Bệnh viện Truyền máu - Huyết học Thành phố Hồ Chí Minh
TS.BS. Trần Thanh Tùng	Trưởng khoa Huyết học, Bệnh viện Chợ Rẫy
TS. Dương Quốc Chính	Trưởng khoa Di truyền - Sinh học phân tử, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
TS.BS. Nghiêm Xuân Hoàn	Phó Chủ nhiệm khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
TS. Trần Thị Huyền Trang	Phó Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng Tế bào gốc, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
TS.BS. Lê Thị Hương Lan	Phó Giám đốc Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên
TS. Hoàng Quốc Trường	Phó trưởng Ban Quản lý chất lượng, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
TS.BS. Dương Hoàng Hào	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Ung bướu Hà Nội
PGS.TS. Hoàng Thị Ngọc Lan	Nguyên Phó Giám đốc Trung tâm Chẩn đoán trước sinh, Bệnh viện Phụ Sản Trung ương
TS.BS. Đinh Thúy Linh	Giám đốc Trung tâm Sàng lọc chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội
TS.BS. Hoàng Hải Yến	Nguyên Phó Giám đốc Trung tâm Sàng lọc chẩn đoán trước sinh và sơ sinh, Bệnh viện Phụ Sản Hà Nội

PGS.TS. Phạm Cẩm Phương	Giám đốc Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai
PGS.TS. Vũ Chí Dũng	Giám đốc Trung tâm Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền và Liệu pháp phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương
PGS.TS. Lương Thị Lan Anh	Giám đốc Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
TS.BS. Ngô Diễm Ngọc	Trưởng khoa Di truyền và Sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương
BSCKII. Trương Thị Hoàng Lan	Phó Giám đốc Trung tâm Giải phẫu bệnh và Sinh học phân tử, Bệnh viện K
PGS.TS. Trần Văn Khoa	Trưởng Bộ môn Sinh học & Di truyền Y học, Học viện Quân Y
PGS.TS. Hà Thị Minh Thi	Trưởng Bộ môn Di truyền Y học, Đại học Y Dược Huế
TS.BS. Nguyễn Thành Khiêm	Bộ môn Phụ sản, Đại học Y Hà Nội
TS.BS. Nguyễn Khắc Hân Hoan	Khoa Xét nghiệm Di truyền Y học, Bệnh viện Từ Dũ
TS.BS. Đoàn Thị Kim Phượng	Phó trưởng Bộ môn Y Sinh học - Di truyền, Đại học Y Hà Nội, Phó trưởng khoa Tế bào - Di truyền, Bệnh viện Phụ sản Trung ương
TS.BS. Nguyễn Hữu Chiến	Trưởng phòng Kế hoạch tổng hợp, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
TS. Nguyễn Bá Khanh	Giám đốc Ngân hàng Tế bào gốc, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
ThS.BS. Đào Nguyên Minh	Trưởng phòng Quản lý chất lượng và Chuyển giao kỹ thuật, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
ThS. Lê Xuân Thịnh	Kỹ thuật viên trưởng Ngân hàng Tế bào gốc, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
TS.BS. Vũ Thị Hà	Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
TS.BS. Vũ Thị Huyền	Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
PGS.TS. Nguyễn Thị Trang	Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
TS. Vũ Thị Bích Hương	Khoa Di truyền – Sinh học phân tử, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương

Thư ký

TS.BS. Nguyễn Hữu Chiến	Trưởng phòng Kế hoạch tổng hợp, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
ThS.BS. Đào Nguyên Minh	Trưởng phòng Quản lý chất lượng và Chuyển giao kỹ thuật, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
ThS.BS. Nguyễn Thị Minh Ngọc	Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
ThS. Hoàng Thu Lan	Trung tâm Di truyền lâm sàng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
TS. Nguyễn Thuận Lợi	Đơn vị Gen - Tế bào gốc, Bệnh viện Bạch Mai
ThS.BS. Bùi Bích Mai	Đơn vị Gen - Tế bào gốc, Bệnh viện Bạch Mai
ThS. Võ Thị Thúy Quỳnh	Đơn vị Gen - Tế bào gốc, Bệnh viện Bạch Mai
ThS. Đoàn Văn Chính	Phó trưởng phòng Kế hoạch tổng hợp, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
ThS.BS. Lê Sinh Quân	Chuyên viên, Phòng Quản lý chất lượng và Chuyển giao kỹ thuật Cục Quản lý Khám, chữa bệnh

LỜI NÓI ĐẦU

Bộ Y tế đã xây dựng và ban hành Tài liệu “Hướng dẫn Quy trình chuyên môn kỹ thuật về Di truyền - Sinh học phân tử” năm 2012, 2014, 2016. Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật này là căn cứ để cơ sở khám bệnh, chữa bệnh, người hành nghề khám bệnh, chữa bệnh, nhân viên y tế triển khai áp dụng và thực hiện kỹ thuật khám, chữa bệnh.

Trong những năm gần đây, với sự phát triển về khoa học kỹ thuật trên thế giới và năng lực người thực hiện kỹ thuật, nhằm cập nhật, bổ sung những tiến bộ mới và tiếp tục chuẩn hóa quy trình thực hiện kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh, Bộ Y tế đã giao một số bệnh viện làm đầu mối xây dựng, cập nhật Hướng dẫn Quy trình chuyên môn kỹ thuật Di truyền - Sinh học phân tử như Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, Bệnh viện K, Bệnh viện Nhi Trung ương, Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Bệnh viện Bạch Mai, các bệnh viện được giao đã huy động và phân công các giáo sư, phó giáo sư, tiến sĩ, bác sĩ chuyên khoa... biên soạn Hướng dẫn quy trình kỹ thuật; tổ chức họp hội đồng khoa học trong bệnh viện để nghiệm thu; biên tập, hoàn thiện theo ý kiến của Hội đồng chuyên môn nghiệm thu do Bộ Y tế thành lập và chịu trách nhiệm về chuyên môn kỹ thuật quy định trong Hướng dẫn quy trình kỹ thuật. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật đều được các thành viên biên soạn rà soát với hướng dẫn hiện hành, tham khảo các tài liệu trong nước, nước ngoài để cập nhật phù hợp với thực tế hiện nay.

Bộ Y tế đã thành lập Hội đồng chuyên môn nghiệm thu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật với sự tham gia của một số Vụ, Cục chức năng của Bộ Y tế, các chuyên gia về Di truyền - Sinh học phân tử trong cả nước. Các thành viên Hội đồng đã làm việc với tinh thần trách nhiệm, đóng góp về thời gian, trí tuệ, kinh nghiệm để góp ý, nghiệm thu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật.

Để hoàn thành Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn Quy trình chuyên môn kỹ thuật về Di truyền - Sinh học phân tử”, Cục Quản lý Khám chữa bệnh - Bộ Y tế trân trọng cảm ơn sự đóng góp công sức, trí tuệ, kinh nghiệm của các giáo sư, phó giáo sư, tiến sĩ, bác sĩ chuyên khoa, chuyên ngành hàng đầu trong lĩnh vực Di truyền Y học và Sinh học phân tử đã tham gia với vai trò là thành viên Ban biên soạn, thành viên Hội đồng góp ý và nghiệm thu Tài liệu chuyên môn.

Trong quá trình biên soạn, biên tập, in ấn tài liệu, mặc dù Ban Biên soạn đã hết sức cố gắng nhưng khó tránh khỏi hoàn toàn những thiếu sót, chúng tôi rất mong nhận được sự đóng góp ý kiến từ quý độc giả đồng nghiệp để Tài liệu chuyên môn ngày một hoàn thiện hơn. Mọi ý kiến góp ý xin gửi về Cục Quản lý Khám, chữa bệnh - Bộ Y tế, 138A, Giảng Võ, Hà Nội.

Trân trọng cảm ơn!

GS. TS. Trần Văn Thuần
THỦ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

NGUYÊN TẮC XÂY DỰNG, BAN HÀNH VÀ ÁP DỤNG HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT TRONG KHÁM BỆNH, CHỮA BỆNH

1. Nguyên tắc xây dựng và ban hành Hướng dẫn quy trình kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh:

- a) Hướng dẫn quy trình kỹ thuật được xây dựng và ban hành theo từng chương, chuyên ngành bảo đảm đầy đủ các nội dung cơ bản về chỉ định, chống chỉ định, thận trọng, chuẩn bị đến các các bước thực hiện kỹ thuật theo trình tự thực hiện từ khi bắt đầu đến khi kết thúc thực hiện kỹ thuật;
- b) Thời gian thực hiện kỹ thuật, nhân lực, thuốc, thiết bị y tế... (danh mục và số lượng) được quy định trong Hướng dẫn quy trình kỹ thuật căn cứ trên yêu cầu chuyên môn, tính phổ biến, thường quy thực hiện tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh. Trong thực tế triển khai, thời gian thực hiện kỹ thuật, nhân lực, thuốc, thiết bị y tế... (danh mục và số lượng) có thể thay đổi dựa trên cá thể người bệnh, tình trạng bệnh, diễn biến lâm sàng... và điều kiện thực tế hạ tầng, thiết bị, nhân lực của mỗi cơ sở khám bệnh, chữa bệnh;
- c) Ngoài địa điểm thực hiện kỹ thuật như phòng phẫu thuật (phòng mổ), phòng thực hiện kỹ thuật (phòng thủ thuật), phòng bệnh... được quy định trong Hướng dẫn quy trình kỹ thuật, kỹ thuật có thể được thực hiện ở các địa điểm khác theo nguyên tắc:
 - Kỹ thuật được quy định thực hiện ở phòng bệnh thì kỹ thuật đó được phép thực hiện tại phòng thực hiện kỹ thuật, phòng phẫu thuật;
 - Kỹ thuật được quy định thực hiện ở phòng thực hiện kỹ thuật thì kỹ thuật đó được phép thực hiện tại phòng phẫu thuật;
 - Các kỹ thuật chỉ được phép thực hiện tại các địa điểm khác trong trường hợp cấp cứu theo quy định pháp luật về khám bệnh, chữa bệnh.

2. Nguyên tắc áp dụng Hướng dẫn quy trình kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh:

- a) Cơ sở khám bệnh, chữa bệnh được phép áp dụng toàn bộ Hướng dẫn quy trình kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh do Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành và phải có văn bản do người đứng đầu cơ sở khám bệnh, chữa bệnh phê duyệt việc triển khai áp dụng toàn bộ Hướng dẫn quy trình kỹ thuật do Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành.
- b) Trường hợp cơ sở khám bệnh, chữa bệnh xây dựng và ban hành Hướng dẫn quy trình kỹ thuật áp dụng tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh thì tuân thủ theo nguyên tắc xây dựng. Căn cứ Hướng dẫn quy trình kỹ thuật tương ứng do Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành, Thủ trưởng cơ sở khám bệnh, chữa bệnh chỉ đạo xây dựng, ban hành, triển khai, áp dụng phù hợp với đơn vị và hoàn toàn trách nhiệm về việc xây dựng, ban hành, triển khai và áp dụng.
- c) Tài liệu chuyên môn Hướng dẫn quy trình kỹ thuật ban hành kèm theo Quyết định này được áp dụng cho các kỹ thuật quy định tại Phụ lục số 02 đồng thời có trong Phụ lục số 01, Thông tư số 23/2024/TT-BYT ngày 18 tháng 10 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành danh mục kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh.

- d) Người thực hiện các kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh là người hành nghề có phạm vi hành nghề phù hợp với kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh, theo quy định của Luật Khám bệnh, chữa bệnh, không bị giới hạn bởi các chức danh nghề nghiệp được liệt kê trong từng quy trình kỹ thuật.
- đ) Cơ sở khám bệnh, chữa bệnh chỉ được thực hiện kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh sau khi được cấp có thẩm quyền phê duyệt, cho phép và sử dụng thuốc, thiết bị y tế được cấp phép theo quy định hiện hành.
- e) Trong quá trình triển khai áp dụng Hướng dẫn quy trình kỹ thuật, nếu có các bất cập hoặc nhu cầu cần sửa đổi, bổ sung, cập nhật..., các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh chủ động cập nhật và ban hành Hướng dẫn quy trình kỹ thuật áp dụng tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh, đồng thời báo cáo, đề xuất Bộ Y tế (Cục Quản lý Khám, chữa bệnh) để xem xét ban hành áp dụng trong cả nước.

MỤC LỤC

1. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ (KARYOTYPE) TẾ BÀO DỊCH ỎI; TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ; GAI RAU	22
2. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ BẰNG KỸ THUẬT ĐỊNH LƯỢNG HUỖNH QUANG (QF-PCR)	36
3. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ BẰNG KỸ THUẬT BOBS	40
4. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ TẾ BÀO ỎI, GAI RAU BẰNG KỸ THUẬT FISH.....	51
5. XÉT NGHIỆM CÔNG THỨC NHIỄM SẮC THỂ (KARYOTYPE) TẾ BÀO MÁU NGOẠI VI; TỦY XƯƠNG; TẾ BÀO MÔ KHÁC	60
6. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ TẾ BÀO MÁU NGOẠI VI; TỦY XƯƠNG; CÁC TẾ BÀO MÔ KHÁC BẰNG KỸ THUẬT FISH	73
7. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ TRÊN TIÊU BẢN MÔ BẰNG KỸ THUẬT FISH.....	81
8. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ THEO DÒNG TẾ BÀO BẰNG KỸ THUẬT FISH.....	88
9. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ KHẢM TRONG GHÉP TẾ BÀO GỐC KHÁC GIỚI BẰNG KỸ THUẬT FISH	93
10. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT PCR	98
11. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX-PCR	109
12. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR.....	120
13. XÉT NGHIỆM GEN TRƯỚC SINH VỚI TẾ BÀO ỎI; GAI NHAU BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN SANGER.....	126
14. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT MLPA.....	142
15. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ GEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SANGER	153
16. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT NGS	166
17. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT DNA MICROARRAY	172
18. XÉT NGHIỆM CÁC BIẾN THỂ GEN ALPHA THALASSEMIA HOẶC BETA THALASSEMIA BẰNG KỸ THUẬT LAI DNA.....	183
19. XÉT NGHIỆM BIẾN THỂ CÁC GEN GLOBIN BẰNG KỸ THUẬT NGS	188
20. XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN VIRUS BẰNG KỸ THUẬT PCR	196

21. XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN VIRUS BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR	201
22. XÉT NGHIỆM ĐỊNH LƯỢNG VIRUS BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR	206
23. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH HLA (MỘT TRONG SỐ CÁC LOCUS: A, B, C, DR, DQ HOẶC DP) BẰNG KỸ THUẬT PCR-SSO.....	213
24. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH HLA (MỘT TRONG SỐ CÁC LOCUS: A, B, C, DR, DQ HOẶC DP) BẰNG KỸ THUẬT PCR-SSP.....	220
25. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH HLA ĐỘ PHÂN GIẢI CAO BẰNG KỸ THUẬT NGS	227
26. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH HLA ĐỘ PHÂN GIẢI CAO BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN SANGER.....	231
27. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ MỌC MẢNH GHÉP (CHIMERISM) VỚI MÁU TOÀN PHẦN BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR.....	235
28. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ MỌC MẢNH GHÉP (CHIMERISM) THEO DÒNG TẾ BÀO BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR.....	240
29. XÉT NGHIỆM GEN VỚI ctDNA BẰNG KỸ THUẬT NGS	245
30. XÉT NGHIỆM LAI TẠI CHỖ GẮN MÀU (ISH).....	251
31. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ PHÂN TỬ BẰNG KỸ THUẬT CISH	259
32. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT PCR-RFLP	266
33. XÉT NGHIỆM CÁC GEN BẰNG KỸ THUẬT MLPA	271
34. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ GEN	283
35. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ ĐƠN GEN BẰNG KỸ THUẬT NGS	297
36. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ ĐA GEN BẰNG KỸ THUẬT NGS	303
37. XÉT NGHIỆM PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG.....	309

PHỤ LỤC

DANH MỤC KỸ THUẬT

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
8382	4	22.385	Xét nghiệm công thức nhiễm sắc thể (Karyotype) tế bào dịch ối; tế bào gốc trung mô; gai rau	Công thức nhiễm sắc thể (NST) từ tế bào ối
8383	5	BS_13.2 69 (bổ sung mã)	Xét nghiệm nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật định lượng huỳnh quang (QF-PCR)	QF-PCR chẩn đoán nhiễm sắc thể 13, 18, 21, XY
8385	7	BS_22.7 03 (bổ sung mã)	Xét nghiệm nhiễm sắc thể bằng kỹ thuật BOBs	BOBS - Chẩn đoán nhiễm sắc thể 13, 18, 21, XY và 9 mất đoạn nhỏ
8386	8	22.386	Xét nghiệm nhiễm sắc thể tế bào dịch ối; gai rau bằng kỹ thuật FISH	FISH chẩn đoán NST 13, 18, 21, XY (chẩn đoán trước sinh)
8390	12	22.381; 22.382; 22.649; 22.650	Xét nghiệm công thức nhiễm sắc thể (Karyotype) máu ngoại vi; tủy xương; tế bào mô khác	Công thức nhiễm sắc thể (Karyotype) tủy xương; Công thức nhiễm sắc thể (Karyotype) máu ngoại vi; Xét nghiệm công thức nhiễm sắc thể tủy xương với chất kích thích đặc hiệu
8392	14	22.379; 22.388; 22.389; 22.390;2 2.391; 22.392; 22.393; 22.394; 22.448;	Xét nghiệm nhiễm sắc thể tế bào máu ngoại vi; tủy xương; các tế bào mô khác bằng kỹ thuật FISH	Xác định gen bằng kỹ thuật FISH; FISH chẩn đoán NST Ph1 (BCR/ABL); FISH chẩn đoán hội chứng Prader Willi; FISH chẩn đoán hội chứng Di George; FISH chẩn đoán chuyển đoạn NST 4;

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
		22.648; 22.661		11; FISH chẩn đoán chuyển đoạn NST 1; 19; FISH chẩn đoán chuyển đoạn NST 8; 21; FISH chẩn đoán chuyển đoạn NST 15; 17; Xác định gen bệnh máu bằng kỹ thuật cIg FISH
8393	15	25.80 (bổ sung mã)	Xét nghiệm nhiễm sắc thể trên tiêu bản mô bằng kỹ thuật FISH	Xét nghiệm FISH
8394	16	25.80 (bổ sung mã)	Xét nghiệm nhiễm sắc thể theo dòng tế bào bằng kỹ thuật FISH	Xét nghiệm FISH
8395	17	22.387; 22.639	Xét nghiệm tỷ lệ khảm trong ghép tế bào gốc khác giới bằng kỹ thuật FISH	FISH chẩn đoán NST XY
8396	18	22.439; 22.405;2 2.441; 22.643;2 2.645	Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật PCR	Xác định gen FLT3-ITD bằng kỹ thuật PCR; PCR chẩn đoán trước sinh bệnh beta thalassemia; Xác định gen IGH-MMSET (của chuyển đoạn t(4; 14) bằng kỹ thuật PCR; Xét nghiệm phát hiện đột biến gen thalassemia bằng kỹ thuật PCR
8397	19	22.426	Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật Multiplex-PCR	Xét nghiệm phát hiện đột biến gene bằng kỹ

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
		(bổ sung mã)		thuật Multiplex PCR (phát hiện cùng lúc 4 đột biến)
8398	20	BS_25.1 61 (bổ sung mã)	Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật Real-time PCR	Real time - PCR
8400	22	22.400; 22.402; 22.403; 22.410; 22.411; 22.414; 22.656; 22.657; 22.658; 22.659; 22.660	Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật MLPA	MLPA chẩn đoán gen SH2D1A của hội chứng XLP; MLPA chẩn đoán bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) - 79 exons; MLPA chẩn đoán trước sinh bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) - 79 exons; MLPA chẩn đoán bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh (CAH); MLPA chẩn đoán trước sinh bệnh Tăng sản thượng thận bẩm sinh (CAH); MLPA chẩn đoán trước sinh gen SH2D1A của hội chứng XLP; Xét nghiệm xác định đột biến gen bằng kỹ thuật MLPA; Xét nghiệm xác định đột biến gen beta thalassemia bằng kỹ thuật MLPA; Xét nghiệm xác định đột biến gen alpha

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
				thalassemia bằng kỹ thuật MLPA
8402	24	25.86 (bổ sung mã)	Xét nghiệm gen trước sinh với tế bào ối; gai nhau bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger	Xét nghiệm giải trình tự gen
8403	25	22.406; 22.407; 22.408; 22.409; 22.412; 22.413; 22.415; 22.416; 22.450; 22.641	Xét nghiệm giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger	Giải trình tự gen chẩn đoán bệnh beta thalassemia; Giải trình tự gen chẩn đoán trước sinh bệnh beta thalassemia; Giải trình tự gen chẩn đoán bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh (CAH); Giải trình tự gen chẩn đoán trước sinh bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh (CAH); Giải trình tự gen Perforin (PRF1) bệnh HLH; Giải trình tự gen Perforin (PRF1) chẩn đoán trước sinh bệnh HLH; Giải trình tự gen SH2D1A của hội chứng XLP; Giải trình tự gen chẩn đoán trước sinh gen SH2D1A; Xác định đột biến gen trong rối loạn chuyển hóa sắt
8404	26	22.406; 22.407;	Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật NGS	Giải trình tự gen chẩn đoán bệnh beta

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
		22.412; 22.413; 22.449; 22.647		thalassemia; Giải trình tự gen chẩn đoán trước sinh bệnh beta thalassemia; Giải trình tự gen Perforin (PRF1) bệnh HLH; Giải trình tự gen Perforin (PRF1) chẩn đoán trước sinh bệnh HLH; Xét nghiệm giải trình tự gen bằng NGS
8405	27	BS_24.3 97 (bổ sung mã)	Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật DNA microarray	Kỹ thuật vi dây (Microarray test)
8411	33	22.446	Xét nghiệm các biến thể gen gây bệnh alpha thalassemia hoặc beta thalassemia bằng kỹ thuật lai DNA	Xét nghiệm xác định đột biến Thalassemia (phát hiện đồng thời 21 đột biến α -Thalassemia hoặc 22 đột biến β -Thalassemia)
8412	34	22.647 (bổ sung mã)	Xét nghiệm biến thể các gen globin bằng kỹ thuật NGS	Xét nghiệm giải trình tự gen bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ 2
8415	37	24.114 (bổ sung mã)	Phát hiện virus bằng kỹ thuật PCR	Virus PCR
8416	38	24.115 (bổ sung mã)	Xét nghiệm phát hiện virus bằng kỹ thuật Real-time PCR	Virus Real-time PCR
8417	39	22.428	Xét nghiệm định lượng virus bằng kỹ thuật Real-time PCR	Định lượng virus Cytomegalo (cmV) bằng kỹ thuật Real Time PCR

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
8419	41	22.365; 22.633	Xét nghiệm xác định HLA (một trong số các locus: A, B, C, DR, DQ hoặc DP) bằng kỹ thuật PCR-SSO	Định typ HLA độ phân giải trung bình đến cao bằng kỹ thuật PCR-SSO trên hệ thống Luminex (cho cả 5 locus A, B, C, DR và DQ); Định type HLA độ phân giải cao cho 1 locus (Locus A, hoặc Locus B, hoặc Locus C, hoặc Locus DR, hoặc Locus DQ, hoặc Locus DP) bằng kỹ thuật PCR-SSO
8420	42	22.360; 22.361; 22.362; 22.363; 22.364; 22.634	Xét nghiệm xác định HLA (một trong số các locus: A, B, C, DR, DQ hoặc DP) bằng kỹ thuật PCR-SSP	Định typ HLA-A độ phân giải cao (bằng kỹ thuật PCR-SSP); Định typ HLA-B độ phân giải cao (bằng kỹ thuật PCR-SSP); Định typ HLA-C độ phân giải cao (bằng kỹ thuật PCR-SSP); Định typ HLA-DR độ phân giải cao (bằng kỹ thuật PCR-SSP); Định typ HLA-DQ độ phân giải cao (bằng kỹ thuật PCR-SSP); Định type HLA cho 1 locus (Locus A, hoặc Locus B, hoặc Locus C, hoặc Locus DR, hoặc Locus DQ) bằng kỹ thuật PCR-SSP

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
8421	43	22.642; 22.366	Xét nghiệm xác định HLA độ phân giải cao bằng kỹ thuật NGS	Định typ HLA bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ 2; Định typ HLA độ phân giải cao bằng NGS (cho cả 5 locus A, B, C, DR và DQ)
8422	44	22.440 (bổ sung mã)	Xét nghiệm xác định HLA độ phân giải cao bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger	Xét nghiệm HLA-B27 bằng kỹ thuật sinh học phân tử
8423	45	22.652; 22.653; 22.422	Xét nghiệm tỷ lệ mọc mảnh ghép (chimerism) với máu toàn phần bằng kỹ thuật Real-time PCR	Xét nghiệm xác định các marker di truyền của người cho/người nhận bằng kỹ thuật real-time PCR; Xét nghiệm chimerism bằng kỹ thuật real-time PCR Định lượng tế bào người cho ở người nhận sau ghép bằng kỹ thuật Real - Time PCR
8424	46	22.653 (bổ sung mã)	Xét nghiệm tỷ lệ mọc mảnh ghép (chimerism) theo dòng tế bào bằng kỹ thuật Real-time PCR	Xét nghiệm chimerism bằng kỹ thuật realtime PCR
8431	53	22.647 (bổ sung mã)	Xét nghiệm gen với ctDNA bằng kỹ thuật NGS	Xét nghiệm giải trình tự gen bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ 2
8439	61	25.84 (bổ sung mã)	Xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu (ISH)	Xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu (CISH)
8440	62	25.84 (bổ sung mã)	Xét nghiệm nhiễm sắc thể phân tử bằng kỹ thuật CISH	Xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu (CISH)

STT trong QTK T (cột 1)	STT kỹ thuật trong Chương (cột 2)	Mã liên kết (cột 3)	Tên kỹ thuật được quy định tại Phụ lục 2 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 4)	Tên kỹ thuật đã được quy định tại Phụ lục 1 Thông tư số 23/2023/TT-BYT (cột 5)
8445	67	22.646 (bổ sung mã)	Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật PCR-RFLP	Xét nghiệm xác định đột biến gen bằng kỹ thuật PCR-RFLP
8450	72	22.656 (bổ sung mã)	Xét nghiệm các gen bằng kỹ thuật MLPA	Xét nghiệm xác định đột biến gen bằng kỹ thuật MLPA
8453	75	25.86 (bổ sung mã)	Xét nghiệm giải trình tự gen	Xét nghiệm giải trình tự gen
8458	80	22.647 (bổ sung mã)	Xét nghiệm giải trình tự đơn gen bằng kỹ thuật NGS	Xét nghiệm giải trình tự gen bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ 2
8459	81	22.647 (bổ sung mã)	Xét nghiệm giải trình tự đa gen bằng kỹ thuật NGS	Xét nghiệm giải trình tự gen bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ 2
8463	85	BS_13.2 68 (bổ sung mã)	Xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng	Xác định đứt gãy DNA của tinh trùng

DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
CES	Clinical Exome Sequencing	Xét nghiệm giải trình tự hệ gen bệnh lý/ Xét nghiệm giải trình tự hệ gen lâm sàng
cfDNA	cell-free DNA	DNA tự do
cffDNA	cell free fetal DNA	DNA tự do của bào thai
CISH	chromogenic in situ hybridization	Xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu
CNVs	Copy number variants-	Các biến thể số lượng bản sao
Ct	Cycle Threshhold	Chu kì ngưỡng
ctDNA	circulating tumor DNA	DNA ung thư lưu hành tự do trong máu
DNA	Deoxyribonucleic acid	DNA
FISH	Fluorescence In situ Hybridization	Lai tại chỗ huỳnh quang
Indel	insert/deletion polymorphism	Đa hình thêm/mất đoạn
ISH	In situ hybridization	Xét nghiệm bằng phương pháp lai tại chỗ
LR-PCR	Longrange - Polymerase Chain Reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi dài
mRNA	Messenger Ribonucleotid acid	RNA thông tin
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	Kỹ thuật khuếch đại đa đầu dò dựa trên phản ứng ghép nối
MRD	Minimum Residual Disease	Tồn dư tối thiểu của bệnh
MS-MLPA	Methylation-Specific MLPA	Kỹ thuật MLPA đặc hiệu cho quá trình methyl hóa

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Multiplex PCR	Multiplex polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi đa mồi
NGS	Next Generation Sequencing	Giải trình tự gen thế hệ mới
NIPT	Noninvasive prenatal test	Xét nghiệm trước sinh không xâm lấn
NST		Nhiễm sắc thể
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms	Phản ứng khuếch đại chuỗi dài-đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn
PGT	Preimplantation genetic testing	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ
PGT	Preimplantation Genetic Testing	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ
PGT- A	Preimplantation genetic testing for aneuploidy	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ lệch bội nhiễm sắc thể
PGT-M	Preimplantation Genetic Testing-monogenic	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen
PGT-M	Preimplantation genetic testing for monogenic gene diseases	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bệnh đơn gen
PGT-SR	Preimplantation Genetic Testing - Structure	Xét nghiệm di truyền trước làm tổ bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể
Pre-PGT-M	Pre- Preimplantation Genetic Testing	Xét nghiệm tiền lâm sàng di truyền trước làm tổ
QF-PCR	Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction	PCR huỳnh quang định lượng
RNA	Axit ribonucleic	RNA

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
RQ-PCR	Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction	Phản ứng khuếch đại và định lượng đoạn DNA hoặc RNA mục tiêu trong thời gian thực
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase sao chép ngược
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Đa hình nucleotide đơn
STR	Short tandem repeat	Các đoạn lặp ngẫu nhiên
VNTR	Variable number tandem repeat	Đa hình số lượng các đoạn lặp
WES	Whole exome sequencing	Giải trình tự hệ gen mã hoá hay giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa - giải trình tự toàn bộ exome
WGA	Whole genome amplification	Khuếch đại toàn bộ hệ gen
WGS	Whole genome sequencing	Giải trình tự bộ hệ gen
PXN	Laboratory	Phòng xét nghiệm

1. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ (KARYOTYPE) TẾ BÀO DỊCH ỒI; TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ; GAI RAU

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm nhiễm sắc thể (Karyotype) để phát hiện các bất thường số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể (NST) phục vụ chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh di truyền/hội chứng bệnh.

Xét nghiệm nhiễm sắc thể từ tế bào dịch ối được chỉ định trong những trường hợp sau:

- Thai có nguy cơ cao mắc các bệnh, hội chứng liên quan đến các bất thường số lượng NST: hội chứng Down, hội chứng Patau, hội chứng Edwards
- Siêu âm thai có dị tật bẩm sinh nặng nề liên quan đến các bất thường cấu trúc NST lớn.
- Tiền sử gia đình có sinh con mang bất thường NST hoặc có bố hay mẹ là người mang chuyển đoạn NST dạng cân bằng.

Xét nghiệm nhiễm sắc thể tế bào gốc trung mô được thực hiện nhằm phát hiện các bất thường số lượng hay cấu trúc NST mục đích quyết định có lưu trữ, sử dụng để điều trị bệnh bằng mẫu tế bào gốc.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật công thức nhiễm sắc thể (Karyotype) là kỹ thuật di truyền dựa trên việc phân tích bộ NST trong 1 tế bào. So sánh bộ NST của người bệnh với bộ NST chuẩn của người về số lượng, kích thước, độ phân giải bằng để đánh giá những bất thường số lượng NST dạng: đa bội, thiếu bội, lệch bội và các bất thường cấu trúc NST dạng: chuyển đoạn, mất đoạn, lặp đoạn, đảo đoạn, NST hình vòng, NST marker.

1.2.2. Nguyên lý

- Trong quá trình mang thai, các tế bào ở da, niêm mạc miệng, hệ thống tiêu hóa, tiết niệu của thai nhi bong ra giải phóng vào buồng ối. Do vậy, nuôi cấy dịch ối sẽ thu hoạch được dòng tế bào của thai nhi.

- Tế bào gốc trung mô là các tế bào gốc trưởng thành đa năng và có đặc tính sinh học đặc biệt. Các tế bào này có khả năng tăng sinh khi được nuôi cấy

ngoài cơ thể và có khả năng biệt hóa thành các tế bào có chức năng trong cơ thể. Trong cơ thể tế bào gốc trung mô tồn tại ở nhiều cơ quan, bộ phận như: mô mỡ, tủy xương, nhau thai, dây rốn. Trong thực tế tế bào gốc trung mô thuộc loại tế bào bám dính (mesenchymal stem cell - MSC) sẽ dễ dàng nuôi cấy và có tính sinh miễn dịch yếu, do vậy ít kích thích phản ứng thải ghép hơn.

- Mẫu dịch ối, tế bào gốc trung mô được nuôi cấy với môi trường giàu dinh dưỡng, nuôi cấy trong thời gian 7-14 ngày. Mẫu bệnh phẩm được nuôi cấy trong chai nuôi cấy thành dòng tế bào, sau đó cấy chuyển sang đĩa petri với lamên làm giá đỡ. Sau nuôi cấy, tế bào được tiếp xúc với chất dừng nguyên phân khi đó sẽ thu được các NST ở kỳ giữa. NST lúc này giãn xoắn tối đa là giai đoạn tối ưu để quan sát hình thái, cấu trúc.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Chai nuôi cấy có ống thông khí; chai thủy tinh (250mL, 500mL...); cốc thủy tinh; ống ly tâm nhọn (15mL).
- Pipet nhựa vô trùng (10mL, 3mL...); đầu côn có phin lọc (1000 μ L, 200 μ L...).
- Đĩa petri 35mm; Đĩa petri thủy tinh.
- Lam kính; Lamên phủ 22x22mm.
- khay đựng ống các thể tích (15 mL...), khay đựng đĩa nuôi cấy.

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Hóa chất dùng chung: nước cất 2 lần; 100% ethanol.
- Ống đựng bệnh phẩm (ống đựng mẫu vô trùng, chống đông heparine); găng tay; khẩu trang; mũ giấy; bông cotton; băng dính; văn phòng phẩm (giấy chỉ định, giấy hẹn trả kết quả xét nghiệm); sát khuẩn tay nhanh; quần áo nhân viên lấy mẫu.
- Hóa chất nuôi cấy:

+ Nuôi cấy tế bào dịch ối: sử dụng môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh là môi trường được bổ sung với FBS Bovine Serum (FBS), L-glutamine và PHA để tối ưu hóa sự bám dính và phát triển của tế bào.

+ Nuôi cấy tế bào gốc trung mô: sử dụng môi trường đặc hiệu (Stempro™ MSC SFM XenoFree...) phù hợp cho sự tăng trưởng và tăng sinh của tế bào trung mô người (MSCs) và tế bào gốc từ mô mỡ (Adipose-derived Stem cells (ADSCs) dạng bám dính. Với môi trường này tế bào MSCs của người có thể được phát triển qua nhiều lần cấy truyền mà vẫn giữ được khả năng biệt hóa thành 3 dòng khác nhau của tế bào trung mô (tế bào xương, sụn, mỡ). Thành phần không chứa Glutamine, kháng sinh, phenol Red.

- Hóa chất thu hoạch tế bào: Trypsin EDTA 1X; Colcemid; Acid acetic; Methanol; KCl;

- Hóa chất nhuộm băng G: PBS; đệm Phosphat (KH_2PO_4 : Na_2PO_4); Giemsa; Trypsin 2,5%; Glycerin; Ethanol tuyệt đối; hóa chất dùng để cố định lamên phủ trên tiêu bản, mục đích lưu giữ lam để kiểm tra lại kết quả phân tích khi cần (DPX moutant)...

- Hóa chất phân tích: dầu soi kính

2.3. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II, tủ nuôi cấy tế bào 37°C, 5% CO_2 ; tủ hút mùi hóa chất độc hại.

- Hệ thống kính hiển vi chụp và phân tích công thức nhiễm sắc thể tự động miễn dịch huỳnh quang, phần mềm phân tích NST Karyotyping.

- Kính hiển vi quang học; kính hiển vi soi ngược.

- Máy li tâm thường

- Pipet aid 5-50mL; Pipet (200 μL và 1000 μL ...); Pipet Spenser (10 mL, 25 mL...)

- Tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C; -40°C; -80°C...).

- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; máy hút dịch, nồi khử trùng ướt; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: dịch ối, tế bào gốc trung mô

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:

- + Dịch ối: thể tích 15-20 mL đựng trong ống đựng mẫu vô trùng.
- + Tế bào gốc trung mô: có thể lấy từ các nguồn như dịch tuỷ xương, mô mỡ, dây rốn, tế bào máu cuống rốn. Tùy thuộc mục đích sử dụng tế bào gốc trung mô để lấy lượng bệnh phẩm phù hợp, tiêu chuẩn lượng mẫu trung bình: 25×10^6 tế bào/ 1mL môi trường nuôi cấy.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.
- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

9 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học.
- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung các bước thực hiện xét nghiệm
- + khay đựng mẫu nuôi cấy, khay chai nuôi cấy thu hoạch, bút các loại
- + Găng tay, cồn tuyệt đối và cồn 70°C, sát khuẩn tay nhanh, đăng kí sử dụng tủ an toàn sinh học, tủ ấm CO₂, máy li tâm, bể ổn nhiệt, tủ ẩm.
- + Ghi tên người bệnh trên chai nuôi cấy theo quy định.
- + Hóa chất cần dùng cho mỗi lần thực hiện quy trình: đảm bảo số lượng, hạn sử dụng, điều kiện bảo quản.
- + Các biểu mẫu theo dõi thực hiện quy trình (nếu có).

4.1.1. Nuôi cấy tế bào

- Thực hiện tất cả các thao tác trong tủ an toàn sinh học cấp II. Ghi đầy đủ thông tin vào phiếu theo dõi sử dụng tủ an toàn sinh học cấp II
- Bật tủ theo đúng trình tự quy định, chạy khởi động trong 5 phút, vệ sinh bề mặt tủ an toàn sinh học bậc II bằng cồn 70°C, sau đó là dung dịch làm sạch và khử khuẩn bề mặt dùng trong y tế.

- Điền đầy đủ thông tin của người bệnh và kiểm tra chất lượng mẫu qua đánh giá thể tích, màu sắc dịch ối, máu cuống rốn, mô dây rốn (vẫn đục, có máu) vào trong phiếu theo dõi thực hành.

- Mỗi người bệnh sẽ có 1 hoặc 2 chai nuôi cấy tùy thuộc vào số lượng xét nghiệm đăng ký làm, viết nhãn có đủ tên, mã số người bệnh, tên bệnh và số thứ tự (nếu có) rồi dán và ngày làm thực hành lên mặt bên của chai nuôi cấy.

- Dịch ối: ly tâm ống đựng dịch ối ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 5 phút. Bỏ phần dịch nổi, kiểm tra lại phần cặn tế bào. Cho 3mL môi trường nuôi cấy vào chai nuôi cấy và 1mL môi trường vào trong ống chứa cặn tế bào. Dùng pipet trộn đều cặn tế bào vào dung dịch. Chuyển toàn bộ phần dung dịch chứa cặn tế bào ối từ ống vào trong chai nuôi cấy, ghi mã số và giữ lại ống chứa cặn tế bào.

- Tế bào gốc trung mô: tùy loại tế bào là máu cuống rốn, mô dây rốn mà định lượng mẫu bệnh phẩm cho vào chai nuôi cấy, lượng mẫu trung bình là 25×10^6 tế bào/1mL môi trường nuôi cấy.

- Dàn đều môi trường trên bề mặt chai nuôi cấy

- Kiểm tra chất lượng và mật độ tế bào bằng kính hiển vi soi ngược

- Đặt chai nuôi cấy vào trong tủ ẩm, 5% CO₂, 37°C.

- Thay môi trường lần 1 sau 72-96h tùy vào tình trạng bám dính và phát triển của tế bào nuôi cấy qua kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược. Dịch nổi trong chai nuôi cấy sau khi hút ra sẽ được giữ trong ống lấy mẫu ban đầu ở ngăn mát tủ lạnh (khoảng 4°C) cho đến khi kết thúc xét nghiệm. Dịch nổi này có thể được sử dụng để nuôi cấy tiếp trong trường hợp cần thiết.

- Thay môi trường mỗi 72 - 96h.

- Kiểm tra sự phát triển của các cụm tế bào để quyết định thời điểm thu hoạch.

4.1.2. Thực hiện thu hoạch tế bào từ chai nuôi cấy

Thông thường thời điểm thu hoạch là sau 8-10 ngày nuôi cấy. Kiểm tra sự phát triển của tế bào dưới kính hiển vi soi ngược để quyết định việc thu hoạch.

- Chuẩn bị trước thu hoạch

- + Rã đông ống trypsin đã chia nhỏ ở 37°C (cần 3mL/chai nuôi cấy).

- + Rửa đông môi trường nuôi cấy nếu cần thiết (cần 10 mL/chai nuôi cấy).
- + Bật đèn tím khử trùng tủ an toàn sinh học cấp II trong tối thiểu 15 phút
- + Chuẩn bị các dụng cụ cần thiết: 01 ống đong 100mL, 2-3 đĩa thủy tinh/người bệnh, 4-6 đĩa nhựa 35mm/người bệnh, panh kẹp, 4-6 lamên 22x22mm ngâm trong cồn tuyệt đối

- Hút hết dịch nổi bằng pipet Pasteur nhựa trong chai nuôi cấy và chuyển vào ống ly tâm vô trùng 15mL (có ghi tên, mã số người bệnh và số thứ tự chai nuôi cấy).

- Cho 1mL Trypsin EDTA 1x vào trong chai nuôi cấy để tráng hết bề mặt. Hút dịch nổi và chuyển vào ống ly tâm 15mL đựng dung dịch ở trên.

- Cho 2mL Trypsin EDTA 1x vào trong chai nuôi cấy, ủ ở 37°C trong 3 phút.

- Kiểm tra lượng tế bào đã tách khỏi bề mặt chai nuôi cấy dưới kính hiển vi soi ngược. Nếu vẫn còn nhiều tế bào bám dính, gõ nhẹ vào thành chai nuôi cấy hoặc dùng dụng cụ nạo tế bào (cell scraper) để tách nốt các tế bào còn trên bề mặt chai nuôi cấy.

- Hút hết dịch nổi trong chai nuôi cấy và chuyển sang ống dịch tế bào ở trên.

- Thêm 1,5mL môi trường nuôi cấy vào để tráng đều bề mặt chai nuôi cấy, và chuyển hết dịch nổi vào ống dịch tế bào ở trên.

- Ly tâm ống dịch tế bào ở 1800 vòng/phút trong 5 phút.

- Kiểm tra cặn tế bào, loại bỏ dịch nổi và thêm vào ống 5 mL PBS vô trùng, ly tâm ống dịch tế bào ở 1800 vòng/phút trong 5 phút. Lặp lại bước này 2 lần.

- Kiểm tra cặn tế bào, loại bỏ phần dịch nổi đến 200 μ L để làm xét nghiệm di truyền phân tử nếu có.

4.1.3. Cấy chuyển tế bào từ chai nuôi cấy sang đĩa Petri và cấy lưu dòng tế bào

- Chuẩn bị các đĩa petri nhựa 35mm với lamên 22x22mm bên trong, ghi mã số, tên người bệnh, đánh số thứ tự các đĩa lên trên bề mặt đĩa. Thông thường sẽ nuôi cấy 4-6 đĩa/người bệnh.

- Thêm 2,5 - 3mL môi trường nuôi cấy vào ống cặn tế bào đã thu hoạch ở phần 4.1.3, trộn đều.

- Hút 500 μ L dịch tế bào dàn đều trên lamên 22x22mm trong đĩa đã chuẩn bị ở trên. Yêu cầu dịch tế bào dàn đều và không tràn ra ngoài lamên. Kiểm tra mật độ tế bào trên kính hiển vi soi ngược để điều chỉnh lượng tế bào nuôi cấy cho phù hợp ở các đĩa tiếp theo.

- Đặt 2 đĩa petri nhựa vào trong 1 đĩa petri thủy tinh và nuôi cấy trong tủ ẩm 37°C, 5% CO₂ từ 4 đến 6h.

- Số cấy còn lại cấy trở lại chai nuôi cấy vừa thu hoạch và bổ sung môi trường nuôi cấy đến 4mL. Chai nuôi cấy này được gọi là mẫu lưu dòng tế bào, được nuôi cấy trong 7 ngày. Trong thời gian này sẽ tiến hành các xét nghiệm được chỉ định. Sau 7 ngày, chai nuôi cấy lưu dòng tế bào sẽ được thu hoạch như phần 4.1.3, tế bào sau nuôi cấy được lưu dòng tế bào bằng cách trữ đông ở nhiệt độ -80°C để thực hiện các xét nghiệm khi cần.

- Kiểm tra trên kính hiển vi soi ngược, nếu các tế bào bám tốt, bổ sung 1mL môi trường nuôi cấy/đĩa, và để trở lại tủ ẩm 37°C, 5% CO₂ qua đêm.

- Kiểm tra mật độ tế bào phù hợp và tiến hành thu hoạch

4.1.4. Thu hoạch Nhiễm sắc thể từ đĩa Petri

- Dùng bơm tiêm 1mL và kim tiêm phù hợp, nhỏ 2 giọt colcemid cho vào mỗi đĩa petri, lắc nhẹ nhàng, để lại trong tủ ẩm 3h30 phút.

- Chuẩn bị hóa chất thu hoạch.

- Quá trình thu hoạch được tiến hành tại nhiệt độ phòng và nên trong tủ hút để tránh mùi của dung dịch CRNAoy:

+ Thêm 3mL KCl/đĩa và để trong 17 phút, hút bỏ hết dịch nổi.

+ Thêm 3mL KCL và để trong 20 phút.

+ Thêm 3mL CRNAoy và để trong 10 phút, hút bỏ hết dịch nổi.

+ Thêm 3mL dung dịch CRNAoy và để trong 20 phút, hút bỏ hết dịch nổi. Lặp lại thêm 2 lần và để lần lượt trong 15 phút và 10 phút.

+ Trong lúc thời gian giữa các bước, chuẩn bị 1 tiêu bản sạch/lamên và để khô, dán nhãn có ghi mã số và tên người bệnh.

+ Nhỏ 1 giọt dung dịch DPX lên tiêu bản, chuyển lamên từ đĩa petri lên trên tiêu bản.

+ Để khô trong điều kiện độ ẩm 80%, nhiệt độ 56°C.

+ Kiểm tra tiêu bản dưới kính hiển vi soi ngược.

+ Giữ tiêu bản ở 37°C trong 72h hoặc 60°C qua đêm.

4.1.5. Nhuộm băng

- Các bước thực hiện:

- + Nhúng tiêu bản vào cốc PBS trong bể ổn nhiệt 37°C.
- + Bước 1: nhúng tiêu bản vào cốc trypsin, thời gian trypsin là 10 giây.
- + Bước 2: rửa tiêu bản qua 2 cốc PBS ở nhiệt độ phòng.
- + Bước 3: ngâm tiêu bản trong dung dịch Giemsa nhuộm 9 phút.
- + Bước 4: rửa nhẹ dưới vòi nước và để khô.
- + Kiểm tra chất lượng băng dưới kính hiển vi.

Chất lượng băng đạt yêu cầu khi đủ 400 băng của thang điểm đánh giá độ phân giải của băng G theo tổ chức di truyền học lâm sàng.

* Nếu chất lượng băng chưa đạt yêu cầu cần tiến hành dò lại tiêu bản theo các bước từ 1-4 để xác định thời gian xử lý trypsin phù hợp. Nếu NST chưa cắt băng thì cần tăng thời gian xử lý trypsin lên 11 giây. Nếu NST bị cắt băng quá mức thì cần giảm thời gian xử lý trypsin xuống 9 giây.

* Nếu chất lượng băng đạt yêu cầu thì tiến hành nhuộm các tiêu bản còn lại theo các bước từ 1-4.

- Tiêu bản sau khi khô hoàn toàn được dán lamên 24x50 mm lên bề mặt bằng dung dịch DPX (nhỏ 2-3 giọt DPX lên bề mặt tiêu bản và phủ lamên lên trên, đuổi hết các bọt khí khỏi tiêu bản).

- Ghi vào phiếu theo dõi thực hiện nuôi cấy, thu hoạch và nhuộm tế bào.

4.1.6. Phân tích nhiễm sắc thể.

- Mỗi mỗi bệnh phẩm cần được đếm và phân tích 20 cụm nhiễm sắc thể, trong đó ít nhất 3 cụm nhiễm sắc thể được lập karyotype.

- Trong trường hợp có dòng tế bào khác: Phân tích ít nhất 30 cụm NST ở hai chai nuôi cấy độc lập.

- Không báo cáo kết quả với các trường hợp khả thi (nếu phân tích 30 cụm NST có thể không báo cáo trường hợp khả $<15\%$; nếu phân tích 50 cụm NST, có thể không báo cáo trường hợp khả $<9\%$).

4.2. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả: thực hiện nội kiểm chất lượng theo quy trình nội kiểm chất lượng.

- Đọc và nhận định kết quả: So sánh kết quả phân tích nhiễm sắc thể của người bệnh với bộ nhiễm sắc thể của người bình thường. Căn cứ vào số lượng,

kích thước và độ phân giải bằng của nhiễm sắc thể đưa ra được kết luận người bệnh có mang bất thường nhiễm sắc thể bất thường về số lượng hoặc cấu trúc.

- Sau khi hoàn thành phân tích, đưa ra kết luận về Karyotype, lựa chọn 1 cụm có chất lượng tốt nhất để báo cáo hình ảnh. Đối với các trường hợp thể khảm, in đủ số ảnh đại diện cho từng dòng tế bào. Yêu cầu về cụm NST làm báo cáo: các băng rõ ràng, các nhiễm sắc thể tách rời nhau, phản ánh đúng và trung thực kết quả bất thường.

- Báo cáo kết quả :Mỗi người bệnh sẽ gồm các trang kết quả: giấy chỉ định xét nghiệm (trang 1), báo cáo kết quả (trang 2) và báo cáo hình ảnh công thức nhiễm sắc thể (từ trang 3, 1 ảnh trong trường hợp kết quả Công thức NST dạng thuần, nhiều ảnh trong các trường hợp có bất thường NST dạng khảm).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu trữ theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm (yếu tố nhiễu) và các phản ứng chéo, các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm: ống đựng mẫu cần vô trùng.

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật: thực hiện lại quy trình kỹ thuật.

- Hóa chất hết hạn sử dụng và không được bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất hoặc không được trộn đều trước khi chia sang các ống nhỏ hoặc trước khi hút: thay hóa chất mới.

- Nhiễm trùng: lấy lại mẫu, và tiến hành lại quy trình kỹ thuật.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật: tiến hành lại xét nghiệm.

- Phân tích kết quả không chính xác: kiểm tra và phân tích chéo kết quả xét nghiệm hoặc xin ý kiến của bác sĩ lâm sàng.

- Mẫu chứng nội kiểm không có kết quả: cấy lại hoặc thay mẫu chứng khác.

- Báo cáo sai kết quả xét nghiệm: thông báo tới lãnh đạo khoa xét nghiệm và sửa lại kết quả xét nghiệm.

- Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả: báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

6.1. Nuôi cấy tế bào

- Mật độ tế bào đạt $\geq 70\%$, nhiều tế bào kì giữa tròn sáng.

6.2. Thu hoạch tế bào sau nuôi cấy

- Chất lượng tế bào dịch ôi hoặc tế bào gốc trung mô sau nuôi cấy đạt tiêu chuẩn thu hoạch khi soi trên kính hiển vi soi ngược quan sát được trên bề mặt chai nuôi cấy có 4-5 clone tế bào bám dính.

Số lượng cụm tế bào ≥ 10 tế bào/ 1 vi trường

6.3. Nhuộm băng G

- Chất lượng băng NST đạt tiêu chuẩn theo quy định: đảm bảo số lượng băng 400-500 băng.

6.4. Phân tích nhiễm sắc thể

Hai nhân viên được đào tạo, có chứng chỉ chuyên môn, phân tích độc lập.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jean McGowan-Jordan, Ottawa, ON Ros J. Hastings.2020. An international system for human cytogenomic nomenclature (ISCN). Karger.

2. Marilyn S Arsham, Margaret J Barch, and Helen J. Lawce; The AGT cytogenetics laboratory manual; 4; The organization for cytogenetics and molecular professionals; Chromosome stain, 235-238.

3. Leversha M, Sinfield C and Webb G; Rapid and reliable methods for the G and C banding of Human Chromosomes; Aust J Med Lab Sci 1; 139-143

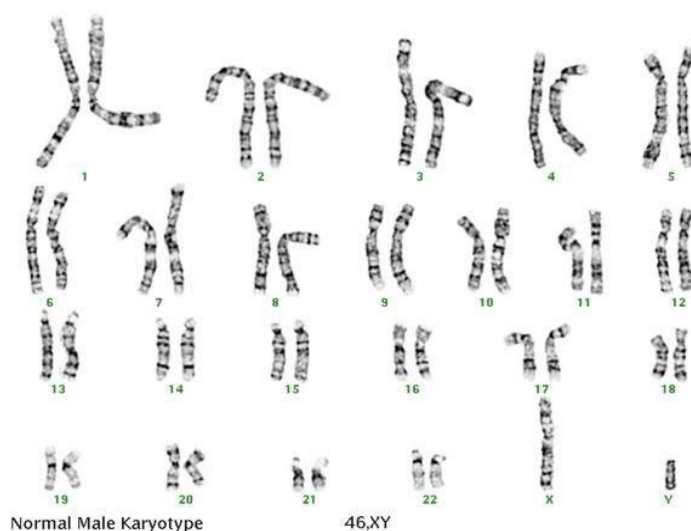
4. Mireille Claustres¹, Viktor Koz'ich², Els Dequeker³ et al. 2014. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing. European Journal of Human Genetics 22, 160-170

5. Trần Đức Phấn, Lương Thị Lan Anh và cs. 2021. Di truyền y học. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

Phụ lục: Hướng dẫn lập Karyotype theo danh pháp quốc tế

- Nhận định bộ NST người:

Bộ nhiễm sắc thể của người bình thường bao gồm 22 cặp NST thường và 1 cặp NST giới tính với karyotype được viết dưới dạng: 46,XX ở người nữ hoặc 46,XY ở người nam. 46 NST người được xếp thành 7 nhóm, ký hiệu là A, B, C, D, E, F và G, theo vị trí của phân tâm.



Hình 1: Công thức nhiễm sắc thể của người nam bình thường

Nhóm A (NST 1,2,3): kích thước lớn nhất, cặp số 1: tâm giữa, cặp số 2: tâm lệch, cặp số 3: tâm giữa.

Nhóm B (NST 4,5): kích thước lớn và tương đồng về chiều dài và đều có tâm lệch.

Nhóm C có 7 cặp NST, bao gồm từ số 6 đến số 12: có kích thước trung bình, tâm lệch. NST X cũng được xếp vào nhóm này.

Nhóm D có 3 cặp NST số 13, 14 và 15 : kích thước trung bình, đều là NST tâm đầu, có vệ tinh gắn vào cánh ngắn.

Nhóm E có 3 cặp NST số 16, 17 và 18, các NST này tương đối ngắn. NST số 16 có tâm giữa, còn cặp số 17 và 18 có tâm lệch.

Nhóm F có 2 cặp NST số 19 và số 20: kích thước ngắn, tâm giữa.

Nhóm G có 2 cặp NST số 21 và số 22: kích thước ngắn, tâm đầu và có vệ tinh. NST Y cũng được xếp vào nhóm này, tuy nhiên NST Y không có vệ tinh.

- Thang điểm đánh giá độ phân giải băng G

Theo tổ chức di truyền học lâm sàng. Cụm NST có thể phân tích cần đảm bảo tối thiểu 400 băng theo tiêu chuẩn của tổ chức di truyền học lâm sàng.

Bảng 1: Thang điểm đánh giá độ phân giải của băng G theo tổ chức di truyền học lâm sàng

Độ phân giải băng	Tiêu chuẩn vùng đánh dấu
300 băng	2 băng tối trên 8p (8p12 và 8p22) 3 băng tối trên 10q (10q21,10q23,10q25) quan sát thấy 20p12, 22q12
400 băng	3 băng tối trên đoạn giữa cánh dài NST số 4 (4q22-q28) 3 băng tối trên đoạn giữa cánh dài NST số 5 (5q14, 5q21, 5q23) 2 băng tối trên 9p (9p21, 9p23) Thấy rõ 13q33
500 băng	Thấy rõ 7q33, 7q35 3 băng tối trên 11p (11p12, 11p14, 11p15.4) Thấy rõ 14q32.2 4 băng tối trên 18q (18q12.1, 18q12.3, 18q21.2, 18q22)
550 băng	Thấy rõ 5q31.2 8p21.2 có thể quan sát được 2 băng tối trên 11pter (11p15.2 và 11p15.4) Thấy rõ 22q13.2
700 băng	Vùng xa 2p25.2 Vùng xa 2q37.2 Phân tích được 10q21.1 và 10q21.3 Phân tích được 17q22-q24 vào vùng 3 băng tối

- Cách viết danh pháp quốc tế

- + Danh pháp quốc tế của các bất thường số lượng, bất thường cấu trúc và đa hình được viết đúng chuẩn của ISCN (*An international system for human cytogenomic nomenclature*).
- + Công thức nhiễm sắc thể được ghi như sau: [tổng số nhiễm sắc thể], [nhiễm sắc thể giới], [bất thường nhiễm sắc thể]. Nhiễm sắc thể thường chỉ được ghi khi có bất thường.
- + Ví dụ: 46,XX: Bộ NST nữ bình thường; 46,XY: Bộ NST nam bình thường
- + Bất thường số lượng NST dùng dấu + (tăng) hoặc - (giảm) viết trước NST để chỉ sự thay đổi số lượng NST, ví dụ: 47,XX,+21.

- + Bất thường số lượng NST giới được ghi như sau:
 45,X: Bộ NST chỉ có 1 NST X (hội chứng Turner)
 47,XXY: Bộ NST có 2 NST X và 1 NST Y (Hội chứng Klinefelter)
 47,XYY: Bộ NST có 1 NST X và 2 NST Y
 48,XXXY: Bộ NST có 3 NST X và 1 NST Y
- + Trong các bất thường NST thì NST giới bất thường được ghi đầu tiên, tiếp theo là các bất thường NST thường sắp xếp theo thứ tự NST từ 1->22, các bất thường viết cách nhau bằng dấu phẩy (,). Ví dụ:
 47,X,i(X)(q10),+21.

Bảng 2: Một số kí hiệu thường dùng trong bất thường cấu trúc NST:

Ký hiệu	Ý nghĩa	Ví dụ
del	Deletion: mất đoạn	46,XX,del(5)(q13). Mất đoạn NST số 5, điểm đứt ở nhánh dài vùng 1, bang 3.
der	Derivative: bắt nguồn từ	46,XX,der(1)t(1;3)(p22;q13.1) NST số 1 bắt nguồn từ chuyển đoạn giữa NST số 1 và NST số 3
dn	Derivative de novo: NST phát sinh có nguồn gốc từ đột biến mới	46,XY,t(5;6)(q34;q23)mat,inv(14)(q12q31)dn: NST số 14 bị đảo đoạn là đột biến mới
dmat/ dpat	NST phát sinh có nguồn gốc từ mẹ/bố	46,XX,der(5)t(2;5)(q21;q31)dmat
dic	Dicentric: NST 2 tâm	45,XX,dic(13;15)(q22;q24) NST 2 tâm với chỗ đứt và nối lại ở băng 13q22 và 15q24
dup	Duplication: nhân đoạn	46,XX,dup(1)(q22q25) nhân 1 đoạn NST số 1 từ bang q22 đến băng q25
h	Heterochromatin: dị nhiễm sắc	16qh+ tăng chiều dài vùng dị nhiễm sắc trên nhánh dài NST 16
i	Isochromosome: NST đều	46,X,i(X)(q10) 1 NST X bình thường và 1 NST đều là nhánh dài NST X

Ký hiệu	Ý nghĩa	Ví dụ
ins	Insertion: chèn đoạn	46,XX,ins(2)(p13q21q31) đoạn nhánh dài giữa băng 2q21 với băng 2q31 đã được gắn vào nhánh ngắn ở vị trí băng 2p13
inv	Inversion: đảo đoạn	46,XX,inv(3)(q21q26) đảo đoạn ngoài tâm, NST đứt và nối lại ở vị trí 3q21 và 3q26
mar	Marker chromosome: NST đánh dấu	47,XX,+mar. Thêm 1 NST marker
pat	Paternal: nguồn gốc từ bố	46,XX,t(5;6)(q34q25)mat: Đột biến chuyển đoạn giữa NST số 5 và NST số 6 nhận từ mẹ. inv(14)(q12q31)pat: Đột biến đảo đoạn NST 14 nhận từ bố
mat	Maternal: nguồn gốc từ mẹ	
p/q	Nhánh ngắn/nhánh dài NST	
r	Ring chromosome: NST hình vòng tròn	46,XX,r(7)(p15q31) NST số 7 dạng vòng
rob	Robertsonian translocation: chuyển đoạn hòa nhập tâm	45,XX,rob(14;21)(q10;q10) Điểm đứt và nối lại xảy ra ở tâm 14q10 và 21q10
s	Satellite: vệ tinh	21ps+ tăng chiều dài của vệ tinh trên nhánh ngắn NST 21
stk	Satellite stalk: thân vệ tinh	21pstk+ tăng chiều dài của thân vệ tinh trên nhánh ngắn NST 21
t	Translocation: chuyển đoạn	46,XX,t(9;22)(q34;q11) chuyển đoạn giữa nhánh dài NST số 9 tại vị trí q34 và nhánh dài NST số 22 tại vị trí q11

2. XÉT NGHIỆM NHIỆM SẮC THỂ BẰNG KỸ THUẬT ĐỊNH LƯỢNG HUỖNH QUANG (QF-PCR)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm QF-PCR dùng để phát hiện lệch bội nhiễm sắc thể ở các cặp NST 13, 18, 21, X, Y...

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

QF-PCR là viết tắt PCR huỳnh quang định lượng. QF-PCR sử dụng kỹ thuật PCR khuếch đại đặc hiệu các đoạn DNA lặp lại ngắn (Short tandem repeat-STR) nằm trên các NST cần khảo sát. Các đoạn STR này được khuếch đại, gắn môi huỳnh quang, sẽ tạo ra các sản phẩm PCR huỳnh quang khác nhau và được định lượng bằng điện di mao quản; kết quả được hiển thị thông qua các đỉnh (peak) trên hệ thống máy quét tự động.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Hóa chất dùng để tách chiết DNA: có thể dùng các phương pháp tách DNA khác nhau đạt tiêu chuẩn như dùng chelex, cột lọc, tự động hoặc thủ công.
- Hóa chất dùng cho phản ứng QF - PCR:
 - Đoạn môi huỳnh quang (primer).
 - DNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).
 - Taq DNA polymerase.
 - Đệm thích hợp.
- Hóa chất điện di huỳnh quang: Hi - DiTM Formamide, Size Standard, gel điện di, Buffer.
- Ống ly tâm 1,5mL.
- Pipet định mức, đầu côn các loại, ống PCR, găng tay, giấy thấm.
- Bơm tiêm, đèn cồn, nhãn dán.

2.3. Trang thiết bị

- Bồn cấy vô trùng;

- Máy Vortex;
- Máy ly tâm, máy ly tâm lạnh, tủ lạnh sâu...;
- Máy nhân gen PCR;
- Hệ thống giải trình tự gen (ví dụ: ABI 3500 hoặc hệ thống máy có thể thực hiện được xét nghiệm này).

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Đối với mẫu dịch ối: 10-15mL dịch ối được lấy vô trùng trong phòng thủ thuật, đựng trong 2 ống ly tâm 15mL vô trùng được vận chuyển về phòng xét nghiệm. Chất lượng mẫu: dịch ối trong, có màu vàng chanh và không lẫn máu.

- Đối với mẫu máu ngoại vi: 1-2 mL máu ngoại vi được lấy và bảo quản trong ống vô trùng chứa chất chống đông EDTA.

- Kiểm tra đôi chiều tên, tuổi, địa chỉ, tuổi thai, chỉ định và ngày chọc ối trên tuýp dịch ối với hồ sơ người bệnh, gắn mã số bệnh phẩm theo mã số của phòng xét nghiệm.

- Mẫu được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ phòng 25oC không quá 24 giờ.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

8 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Sử dụng trang thiết bị bảo hộ cá nhân: găng tay, áo blouse, khẩu trang khi thực hiện xét nghiệm.

- Tuân thủ các nguyên tắc an toàn sinh học phòng xét nghiệm.

- Các thao tác trong quy trình cần đảm bảo vô trùng.

- Không để hóa chất tiếp xúc với da, mắt. Trong trường hợp tiếp xúc với mắt, rửa ngay mắt với nước sạch và tìm tư vấn y tế.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Bước 1: Tách chiết DNA bằng phương pháp Chelex (có thể dùng các phương pháp khác tương đương)

- Lấy 1500 μ L dịch ối vào ống ly tâm 1,5 mL, ly tâm dịch ối ở 13.000 vòng/phút trong 3 phút. Giữ cạn.
- Đối với mẫu máu ngoại vi, lấy 200 μ L vào ống ly tâm 1,5 mL.
- Lấy Chelex để ở nhiệt độ phòng 5 phút (dùng máy khuấy từ làm tan Chelex).
- Cho 30 μ L Chelex vào mỗi mẫu, vortex.
- Cho mẫu vào máy chạy PCR để tách DNA theo chương trình DNA prep.
- Sau khi PCR, vortex mẫu và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 3 phút.

Bước 2: Chạy PCR bằng các cặp mồi huỳnh quang

- Chuẩn bị Mastermix PCR.
- 7 μ L S1 + 3 μ L pcrmix + 5 μ L DNA.
- 7 μ L S2 + 3 μ L pcrmix + 5 μ L DNA.
- Chạy PCR theo chương trình tương ứng.
- Sau khi chạy PCR, vortex mẫu và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 3 phút.

Bước 3: Điện di sản phẩm PCR trên máy đọc trình tự tự động:

- Chuẩn bị Mastermix: 15 μ L Formamide tinh khiết + 0,3 μ L size standard + 1 μ L sản phẩm PCR (S1+S2).
- Chạy PCR biến tính DNA theo chương trình Denature trong 2 phút ở 96°C.
- Thiết lập chương trình chạy máy Điện di mao quản.

4.2. Nhận định kết quả

- Ngưỡng tối đa của cường độ tín hiệu huỳnh quang các peak để phân tích là ≤ 6000 RFU

Ngưỡng tối thiểu của cường độ tín hiệu huỳnh quang các peak: ≥ 200 RFU.

- Các trường hợp bình thường thấy được 2 alen thông qua hình ảnh 2 đỉnh (peak) với tỷ lệ 1:1 và xuất hiện ở ít nhất 2 marker đối với từng NST.

- Các mẫu trisomy sẽ tạo ra kiểu 3 alen hay 2 alen không cân xứng các marker trên NST tương ứng. Việc chẩn đoán trisomy được chấp nhận khi có ít nhất 2 marker ở trên cùng một NST có dạng 3 alen hay 2 alen không cân xứng và các marker còn lại của NST quan tâm ở trạng thái không kết luận.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- In phiếu trả kết quả bằng phần mềm.
- Sao lưu kết quả và lưu trữ.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Cường độ tín hiệu huỳnh quang các peak vượt ngưỡng tối đa: cần pha loãng nồng độ DNA đầu vào PCR mix.
- Cường độ tín hiệu huỳnh quang các peak dưới ngưỡng tối thiểu: cần tăng nồng độ DNA đầu vào PCR mix.
- Các mẫu không đủ 2 marker bình thường hoặc bất thường trở lên không đủ điều kiện trả kết quả; các trường hợp nghi ngờ (các marker chỉ lên 1 đỉnh, nhiều...) đều cho chạy lại bằng extra marker hoặc chạy lại mẫu.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện kiểm tra hoạt động của máy định kỳ theo quy trình của hãng.
- Hoá chất còn hạn sử dụng và được bảo quản theo hướng dẫn trên kit.
- Kết quả kiểm tra chất lượng, đánh giá theo *Quy trình đảm bảo chất lượng xét nghiệm*.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ- BYT ngày 25/2/2015 của Bộ trưởng Bộ Y Tế, hướng dẫn xây dựng quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh.
2. Hướng dẫn sử dụng hệ thống giải trình tự gen ABI 3130.
3. Quy trình xét nghiệm của bộ kit xét nghiệm Aneufast QF.
4. Badenas C. et al (2010): Assessment of QF-PCR as the First Approach in Prenatal Diagnosis. *Journal of Molecular Diagnosis*. 12 (6), 828-834.
5. Mann K., Ogilvie C.M. (2012): QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenatal Diagnosis* 2012. 32, 309-314.
6. Faas, B.H., Cirigliano, V. (2011): Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. in *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 81-87.
7. Moftah, R., Marzouk, S., El-Kaffash, D., Varon, R., Bommer, C., Karbasiyan, M., et al. (2013): QF-PCR as a molecular-based method for autosomal aneuploidies detection. *Advances in Reproductive Sciences*. 1 (03), 21.

3. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ BẰNG KỸ THUẬT BOBS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích

Phát hiện các lệch bội của nhiễm sắc thể 13, 18, 21, X và Y, và các bất thường cấu trúc của các vùng nhiễm sắc thể liên quan đến các hội chứng vi mất đoạn. Xét nghiệm này được sử dụng để phát hiện các thêm hoặc mất nhiễm sắc thể trong các vùng nhiễm sắc thể liên quan tới 9 hội chứng vi mất đoạn (microdeletion syndromes) và các lệch bội nhiễm sắc thể 13, 18, 21, X và Y của mẫu bệnh phẩm máu ngoại vi, dịch ối,.. trên hệ thống thiết bị đo huỳnh quang (Luminex 100/200,...).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Việc phân tích được dựa trên công nghệ BACs-on-Beads, sử dụng các hạt huỳnh quang Luminex được gắn các đầu dò DNA (được tạo từ nhiễm sắc thể người cấy trên vi khuẩn - bacterial artificial chromosomes). 5 đầu dò khác nhau được sử dụng cho mỗi nhiễm sắc thể 13, 18, 21, X và Y cùng với 4 tới 8 đầu dò khác nhau cho mỗi vùng liên quan tới vi mất đoạn. Sau đó thực hiện quá trình lai của mẫu đã được gắn nhãn và DNA chứng vào các đầu dò được thiết kế trên hạt BoBs. DNA của mẫu thực được thực hiện đơn. Các DNA chứng được thực hiện đôi. Sau khi quá trình lai kết thúc, tín hiệu được đọc với hệ thống thiết bị Luminex 100/200 cùng phần mềm xPONENT 3.1. Phần mềm phân tích kết quả BoBsoft lấy thông số tín hiệu từ Luminex 100/200 và so sánh cường độ tín hiệu giữa mẫu thực và mẫu chứng, từ đó nhận định về tình trạng nhiễm sắc thể trong vùng thiết kế.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư, hóa chất

- Hóa chất xét nghiệm Prenatal BoBs (hoặc bộ kit tương đương)
- + Hộp P1: bảo quản tại -30°C tới -16°C.
- + Hộp P2: bảo quản tại 2 - 8 °C.
- + Sau khi mở, các thành phần của hóa chất trong hộp P1 ổn định trong 4

tuần với 8 vòng rã đông/đông lạnh.

+ Sau khi mở, các thành phần của hóa chất trong hộp P2 ổn định trong 4 tuần tại điều kiện bảo quản.

- DNA chứng nam, DNA chứng nữ.
- Dung môi PBS, nước khử Ion.
- 70% Ethanol, 100% Ethanol.
- Hóa chất tách chiết DNA.

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống Luminex200 (hoặc hệ thống tương đương).
- Ống lấy mẫu vô trùng 15mL.
- Chai nuôi cấy vô trùng 25mL.
- Ống ly tâm 1,5mL.
- Ống PCR 0,2mL.
- Máy Vortex.
- Buồng cấy vô trùng, bơm tiêm, nhãn dán.
- Máy ly tâm lạnh, tủ lạnh.
- Máy nhân gen PCR.
- Đĩa tinh sạch 96 giếng, đĩa PCR 96 giếng, dải nắp ống cho đĩa, đĩa lọc hút chân không.
- Máng đựng hóa chất, tấm dán nhựa bảo vệ các đĩa.
- Pippet, pippet đa kênh các thể tích.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Đối với mẫu dịch ối: 10-15mL dịch ối được lấy vô trùng trong phòng thủ thuật, đựng trong 2 ống ly tâm 15mL vô trùng được vận chuyển về phòng xét nghiệm. Chất lượng mẫu: dịch ối trong, có màu vàng chanh và không lẫn máu.

- Đối với mẫu máu ngoại vi: 1-2 mL máu ngoại vi được lấy và bảo quản trong ống vô trùng chứa chất chống đông EDTA.

- Kiểm tra đối chiếu tên, tuổi, địa chỉ, tuổi thai, chỉ định và ngày chọc ối trên tuýp dịch ối với hồ sơ người bệnh, gắn mã số bệnh phẩm theo mã số của phòng xét nghiệm.

- Mẫu được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ phòng 25°C không quá 24 giờ

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật**

36 giờ

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đi găng tay, mặc áo blouse, đeo khẩu trang khi thực hiện xét nghiệm.
- Tuân thủ các nguyên tắc an toàn sinh học phòng xét nghiệm.
- Các thao tác trong quy trình nuôi cấy cần đảm bảo vô trùng.
- Không để hóa chất tiếp xúc với da, mắt.
- Đảm bảo như nhiệt độ, độ ẩm, môi trường không nhiễm khuẩn.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**4.1. Các bước thực hiện**

- Tách chiết DNA

Bước 1: Gắn nhãn DNA: thực hiện với việc sử dụng enzyme để kết nối các nucleotide đã được gắn biotin.

Bước 2: Tinh sạch DNA đã được gắn nhãn: sử dụng hóa chất tinh sạch cho sản phẩm PCR.

Bước 3: Lai DNA: sản phẩm DNA đã được gắn nhãn được lai với các hạt Beads.

Bước 4: Rửa sản phẩm và gắn các phân tử huỳnh quang báo cáo.

Bước 5: Sử dụng máy phân tích và đọc tín hiệu huỳnh quang tương thích.

Lưu ý: Đưa các hóa chất ra khỏi tủ âm sâu và để các hóa chất tại nhiệt độ phòng từ 15 - 30 phút trước khi sử dụng. Đảm bảo các hóa chất đã được rửa đồng trước khi sử dụng:

- Mẫu DNA đã tinh sạch.
- Random Primer Solution.
- Biotin-dNTP Mix.
- Polymerase.

Lưu ý: Đưa các hóa chất từ tủ lạnh (2 - 8 °C) và để các hóa chất tại nhiệt độ phòng từ 15 - 30 phút trước khi sử dụng:

- Sample Diluent.
- DNA chứng (nữ).

- DNA chứng (nam).

Trước khi sử dụng, lắc (vortex) đều và ly tâm nhanh (spin down) các mẫu DNA cần xét nghiệm, mẫu DNA chứng và các hóa chất sử dụng (**NGOẠI TRỪ POLYMERASE**). Để các hóa chất tại nhiệt độ phòng để đảm bảo độ hòa tan và trộn tối đa.

Mẫu DNA

- Nồng độ DNA yêu cầu tối thiểu đạt trên 2,1ng/μL, độ tinh sạch OD 260/260nm từ 1,8 - 2,2, với những mẫu DNA có nồng độ trên 10ng/μL cần được pha loãng để nồng độ DNA trên tổng thể tích đạt trong khoảng 50 - 250ng trong tổng thể tích 24μL.

- Xét nghiệm đã được kiểm chứng với lượng mẫu DNA đầu vào từ 50 - 250ng với tổng thể tích 24μL.

- DNA sau khi được tách và tinh sạch có thể được bảo quản trong môi trường Tris-EDTA (pH 7,2) tại 2 - 8°C trong 1 năm, tại -20°C trong vòng 2 năm, và tại -70°C cho ít nhất 7 năm.

Bước 1: Ghi nhãn DNA (Labeling of Genomic DNA)

- Việc ghi nhãn có thể được thực hiện sử dụng đĩa PCR hoặc ống PCR 250μL hoặc dải ống PCR.

- Chuẩn bị 2 phản ứng cho mỗi DNA chứng. Chuyển 50ng DNA chứng nam và chứng nữ vào ống tương đương. Thêm dung dịch Sample Diluent để đưa thể tích từng ống tới 24μL.

- Chuẩn bị 1 phản ứng cho mỗi DNA thực. Chuyển 24μL DNA mẫu thực vào ống nếu DNA đầu vào trong khoảng 2,1 - 10ng/μL. Thêm Sample Diluent để pha loãng và đưa thể tích từng ống tới 24μL nếu nồng độ DNA đầu vào lớn hơn 10ng/μL.

Ghi chú: 24 μL là thể tích bắt buộc cho từng ống mẫu. Các mẫu DNA đầu vào với nồng độ <2,1ng/μL không đủ chất lượng và số lượng để làm xét nghiệm.

- Vortex và spin down ống chứa dung dịch Random Primer Solution, sau đó thêm 20μL dung dịch này vào từng ống mẫu. Vortex các ống 30 giây và spin down.

Ghi chú: Tổng thể tích của ống mẫu tại thời điểm này là: 24μL (DNA mẫu trong Sample Diluent) + 20μL (Random Primer Solution) = **44μL**.

- Đóng chặt các nắp ống và đưa các ống vào máy nhân gen PCR (PCR thermal cycler). Biến tính tại 98°C trong 5 phút, và hạ nhiệt tới 37°C. Thực hiện bước tiếp theo ngay khi máy PCR đạt 37°C.

- Chuẩn bị dung dịch ghi nhãn (Labeling Mix) trong ống 1,5mL. Vortex Biotin-dNTP Mix (NGOẠI TRỪ POLYMERASE - có thể dùng tay búng nhẹ vài lần vào ống) và ly tâm nhẹ (spin down) cả hai ống. Thể tích được tính toán thừa để bù trừ cho lỗi hút. Hút lên xuống 5 - 10 lần dung dịch Labeling Mix và spin down trước khi sử dụng:

Bảng 1. Thể tích các hóa chất dùng cho ghi nhãn AND (gắn Biotin)

Hóa chất	Thể tích/phản ứng (μL)	Số phản ứng	Thể tích cần (μL)
Biotin-dNTP Mix	5,5		
Polymerase	1,1		
Tổng thể tích của Labeling Mix(μL)			

- Hút 6μL của Labeling Mix vào từng ống mẫu. Dùng pipet để hút lên xuống dung dịch trong ống ít nhất 5 lần và ly tâm nhanh (spin down).

- Đóng chặt các nắp ống và ủ các ống mẫu trong máy PCR tại 37°C trong vòng 60 - 90 phút. Đưa các hóa chất trở về điều kiện bảo quản sau bước này.

- Trong lúc chờ đợi phản ứng PCR kết thúc, chuẩn bị cho bước tiếp theo (Tinh sạch sản phẩm DNA ghi nhãn). Khi chương trình PCR kết thúc, đưa các ống mẫu khỏi máy PCR.

Ghi chú: Nếu như bước tinh sạch chưa thể thực hiện ngay, bảo quản sản phẩm tại 4°C trong 6 tiếng hoặc -20°C qua đêm.

Bước 2: Tinh sạch sản phẩm DNA ghi nhãn (Purification of labeled DNA)

Sử dụng đĩa tinh sạch 96 giếng.

- Chuyển 50μL từ mỗi ống mẫu sang giếng tương đương sử dụng pipet thường hoặc đa kênh.

Ghi chú: Chuyển mẫu thật chậm trực tiếp lên màng (không chọc màng); tránh nhỏ mẫu vào thành giếng.

- Đặt đĩa tinh sạch lên bộ hút chân không. Áp dụng mức chân không khoảng 190 mmHg cho tới khi chất lỏng được hút hết hoàn toàn (khoảng 10 phút). Tắt máy hút chân không.

- Thêm 50µL dung môi TE (TE buffer) vào từng giếng. Áp dụng mức chân không khoảng 190mmHg cho tới khi chất lỏng được hút hết hoàn toàn (khoảng 10 phút). Tắt máy hút chân không.

- Thâm khô đáy các giếng của đĩa tinh sạch sử dụng giấy thấm.

- Thêm 25µL dung môi TE vào từng giếng trên đĩa.

- Đưa đĩa vào máy lắc ủ và lắc tại nhiệt độ phòng với tốc độ 1200 nhíp/phút trong 5 phút.

Chuyển 20µL của từng mẫu DNA vào ống PCR mới để pha loãng nếu cần thiết.

- Đo nồng độ DNA tinh sạch:

- Sử dụng máy quang phổ UV (Nanodrop) để đo nồng độ DNA của từng mẫu đã được ghi nhãn sau khi tinh sạch.

Ghi chú: DNA ghi nhãn sau khi tinh sạch có thể được bảo quản qua đêm tại nhiệt độ 2 - 8°C (không để quá lâu ảnh hưởng xấu đến kết quả). Nếu để qua đêm, lắc lại đĩa với máy lắc ủ trước khi sử dụng.

Bước 3: Lai DNA (DNA Hybridization)

- Đưa dung dịch lai Hybridization Buffer ra khỏi tủ âm sâu và BACs-on-Beads Mix từ tủ lạnh ra để thực hiện bước tiếp theo.

- Cài máy lắc ủ tới 52°C

- Pha loãng nồng độ DNA từ bước 2 xuống 200ng/µL nếu cần thiết (nếu nồng độ đo được >200ng/µL). Nếu nồng độ trong dải 150 - 200ng/µL, DNA có thể được sử dụng trực tiếp.

- Pha loãng: sử dụng dung môi TE để pha loãng:

Thể tích TE cần cho = ((nồng độ đo được/200) x 18,5) - 18,5 µL

- Tạo sơ đồ mẫu cho đĩa thực hiện bước ủ để các mẫu được đánh dấu với từng giếng.

- Sử dụng bảng sau để chuẩn bị Hybridization Mix cho bước lai ủ. Thể tích thừa đã được tính toán theo bảng sau:

Bảng 2. Thể tích các hóa chất cho xét nghiệm lai DNA

Hóa chất	Thể tích/phản ứng (µL)	Số phản ứng	Thể tích cần (µL)
Hybridization Buffer	11		
BACs-on-Beads Mix	1,0		
Tổng thể tích của Hybridization Mix (µL)			

- Đảm bảo Hybridization Buffer đã đạt nhiệt độ phòng. Vortex 3 lần, mỗi lần 10 giây sau đó ly tâm nhanh (spin down).

- Hút lượng Hybridization Buffer cần thiết vào ống ly tâm 1,5mL

Ghi chú: Khi hút dung dịch Hybridization Buffer, lưu ý thao tác thật chậm vì độ nhớt của dung dịch này rất cao.

- Vortex BACs-on-Beads Mix 3 lần, mỗi lần 10 giây ngay trước khi dùng và hút lượng thể tích cần thiết vào ống Hybridization Mix.

- Ly tâm rất nhanh ống Hybridization Mix và vortex 3 lần, mỗi lần 10 giây.

- Chuyển 11 μ L của Hybridization Mix vào từng giếng đã được dựng trong sơ đồ.

Ghi chú: Thao tác hút rất chậm vì dung dịch có độ nhớt cao

- Chuyển 5 μ L của DNA mẫu đã được tinh sạch vào đáy mỗi giếng có chứa Hybridization Mix (sử dụng pipet thường hoặc đa kênh).

- Đậy nắp của đĩa cho các giếng với nắp thích hợp. Đảm bảo các nắp đã được đóng thật chặt.

- Chuyển đĩa mẫu ủ vào máy lắc ủ tại 52°C và lắc tại 800 vòng/phút trong 5 phút.

- Đặt đĩa vào máy PCR và biến tính tại 85°C trong 5 phút, và hạ nhiệt xuống tới 52°C.

- Khi máy PCR đã đạt 52°C, đưa đĩa khỏi máy PCR và một lần nữa đảm bảo các nắp trên đĩa đã được đóng thật chặt.

- Để đĩa rất nhanh vào máy lắc ủ tại 52°C và lắc tại 800 vòng/phút trong vòng 16 - 20 tiếng.

- Đảm bảo túi đá được chuẩn bị và được cho vào tủ lạnh âm sâu - chuẩn bị cho bước hạ nhiệt máy lắc ủ trong bước 4.

Bước 4: Rửa DNA và gắn phân tử báo cáo (DNA Washing and Reporter binding)

- Bật máy để laser và hệ thống được khởi động ít nhất trước 30 phút trước khi sử dụng.

- Lấy dung dịch Wash Buffer 1 từ tủ lạnh.

- Tính toán lượng Wash Buffer 1 cần sử dụng. 125 μ L được cần cho mỗi giếng (thể tích thừa để bù trừ khi sử dụng pipet đa kênh).

- Lấy đĩa ủ lại từ máy lắc ủ (52°C) và ngay lập tức cài chế độ 50°C cho máy lắc ủ.

- Tháo các nắp giếng cẩn thận và nhẹ nhàng. Thêm 100µL của dung dịch Wash Buffer 1 vào từng giếng (dùng pipet đơn hoặc đa kênh). Hút nhanh lên xuống 10 lần liên tục để trộn dung dịch.

- Ủ đĩa tại 50°C và ở tốc độ lắc 1200 vòng/phút trong 20 phút.

- Chuẩn bị dụng cụ để hạ máy lắc ủ xuống 37°C.

- Trong lúc chờ đợi, lấy Reporter Concentrate, Reporter Diluent, và Wash Buffer 2 từ tủ lạnh và chuẩn bị Reporter Mix.

- Sử dụng bảng sau để tính toán lượng hóa chất cần thiết:

Bảng 3: Thể tích các hóa chất cho sửa AND và gắn phân tử báo cáo

Hóa chất	Thể tích/phản ứng (µL)	Số phản ứng	Thể tích cần (µL)
Reporter Concentrate	0,45		
Reporter Diluent	112,5		
Tổng thể tích của Reporter Mix (µL)			

- Pipet lượng thể tích cần thiết của Reporter Diluent vào ống thích hợp.

- Vortex Reporter Concentrate trong 5 giây, spin down và pipet lượng cần thiết vào ống Reporter Mix. Ngay lập tức, gói ống Reporter Mix vào giấy bạc để tránh ánh sáng.

- Vortex Reporter Mix 5 giây.

- Đĩa lọc 0,45µm được sử dụng cho việc rửa và gắn phân tử Reporter. Tạo sơ đồ mẫu trên đĩa.

- Đậy lại các giếng chưa sử dụng trên đĩa lọc với miếng dán đĩa bằng nhựa trong.

- Tính toán thể tích Wash Buffer 2 cần thiết. 0,47 mL cần cho mỗi giếng (thể tích thừa để bù trừ khi sử dụng pipet đa kênh đã được kết hợp).

- Thêm 30µL của Wash Buffer 2 vào các giếng sẽ sử dụng trên đĩa lọc để tạo ẩm cho các giếng này. Không chạm màng của đĩa lọc.

- Lấy đĩa ủ lại ra khỏi máy lắc ủ (50°C). Ngay lập tức, cài đặt máy vào chế độ lắc tại 37°C. Đưa tấm đá trong tủ âm sâu vào máy lắc ủ, tháo các giá đỡ đĩa để hạ nhiệt máy xuống 37°C. Sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch trong các giếng của đĩa ủ lại sang đĩa lọc đã được tạo ẩm.

- Sử dụng hệ hút chân không tại áp suất 125mmHg để hút dung dịch trong các giếng của đĩa ủ trong vòng khoảng 5 giây để chuyển toàn bộ dung dịch trong giếng và dừng lại ngay khi hết dung dịch.

- Thêm 100µL dung dịch rửa Wash Buffer 2 vào từng giếng. Không chạm màng lọc. Lặp lại bước rửa

- Cho thêm 100µL dung dịch rửa Wash Buffer 2 vào từng giếng. Không chạm màng lọc. Lặp lại bước rửa

- Lau khô đáy đĩa lọc bằng giấy thấm.

- Thêm 100µL của Reporter Mix vào từng giếng của đĩa lọc. Không chạm màng lọc.

Ghi chú: Đảm bảo máy lắc ủ đã đạt 37°C tại thời điểm này. Không đợi quá 15 phút giữ đĩa lọc tại nhiệt độ phòng và bảo vệ khỏi ánh sáng.

- Ủ đĩa lọc trong máy lắc ủ tại 37°C trong 30 phút.

- Sau bước ủ với Reporter Mix, sử dụng bộ hút chân không để loại bỏ dung dịch trên đĩa.

- Cho thêm 100µL của Wash Buffer 2 vào từng giếng. Lặp lại bước 4.18

- Lau khô đáy đĩa lọc bằng giấy thấm.

- Cho thêm 100µL của Wash Buffer 2 vào từng giếng. Không chạm màng lọc.

Ghi chú: Không hút chân không sau bước này. Đĩa lọc được chuyển và đọc với hệ thống đọc và phân tích tín hiệu huỳnh quang tương thích (Luminex 100/200...). Nếu như bước đo không được thực hiện ngay, gói đĩa trong giấy bạc để bảo vệ khỏi ánh sáng.

Bước 5: Đọc tín hiệu xét nghiệm

- Khởi động máy trước khi đọc tín hiệu. Hệ thống đã được thực hiện hiệu chuẩn và xác minh (calibration/verification) và đầu kim đã được điều chỉnh độ cao cho đĩa lọc.

- Mở protocol xét nghiệm.

- Đặt tên file xuất dữ liệu.

- Điền tên vào sơ đồ đĩa (F, M và mẫu thực...).

Ghi chú: Mẫu DNA chứng nam và nữ phải luôn được đặt tên tương đương là M và F.

- Đưa đĩa lọc vào máy, làm theo hướng dẫn và bắt đầu đọc tín hiệu.

- Sau khi đọc, chạy chu trình tắt máy theo hướng dẫn.
- Đổ bỏ các dung môi rửa Wash.

4.2. Nhận định kết quả

- Phân tích kết quả.
- Đánh giá kết quả: Các loại đột biến tương ứng với tỷ lệ tín hiệu huỳnh quang: Bình thường khi tỷ lệ từ 0,8 - < 1,3; mất đoạn khi tỷ lệ này < 0,8; nhân đoạn khi tỷ lệ $\geq 1,3$. Mất hoặc thêm đoạn của một vùng được chấp nhận khi có 3 đầu dò trở lên biểu hiện ngoài định mức cut-off của xét nghiệm.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- In phiếu trả kết quả bằng phần mềm.
- Sao lưu kết quả và lưu trữ.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

STT	Nội dung	Xử trí
1	DNA không đạt nồng độ/tinh sạch.	Tách chiết DNA lại với thể tích mẫu nhiều hơn, tế bào nhiều hơn.
2	Tỷ lệ tín hiệu trong ngưỡng ranh giới bình thường và bất thường.	Xét nghiệm độc lập thứ 2 để khẳng định nếu lâm sàng có nghi ngờ bất thường.
3	Điều kiện lai qua đêm ko ổn định về nhiệt độ, tốc độ lắc	Kiểm tra chế độ thiết lập và ổn định nguồn điện
4	Sai lệch trong thao tác hút mẫu - pipet.	Kiểm tra chéo ngẫu nhiên các bước thao tác

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Chạy hiệu chuẩn theo quy định của hãng theo các mức ngày, tuần, tháng.
- Chạy kiểm tra cho mỗi Kit hóa chất mới
- Chạy kiểm tra sau khi tiến hành hiệu chuẩn hay thiết lập đường chuẩn mới.
- Kết quả kiểm tra chất lượng, đánh giá theo *Quy trình đảm bảo chất lượng xét nghiệm*

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hướng dẫn sử dụng hệ thống Luminex200
2. Hướng dẫn sử dụng bộ Kit Prenatal BobS
3. Driscoll, D.A. and Gross S. (2009): Prenatal screening for aneuploidy. N. Engl. J. Med. 360 (24), 2556-2562.
4. Shaffer, L.G. (2001): Diagnosis of microdeletion syndromes by fluorescence *in situ*
5. Hybridization (FISH). Curr. Protoc. Hum. Genet. 8.10, 1-4.
6. Savva, G.M., Walker, K., and Morris, J.K. (2010): The maternal age-specific live birth prevalence of trisomies 13 and 18 compared to trisomy 21 (Down syndrome). Prenat. Diagn. 30, 57-64.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (2005): Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
8. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 88, December 2007: invasive prenatal testing for aneuploidy. Obstet Gynecol. 2007; 110, 1459-1467.

4. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ TẾ BÀO ỒI, GAI RAU BẰNG KỸ THUẬT FISH

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm nhiễm sắc thể tế bào dịch ối bằng kỹ thuật bằng kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (Fluorescence In situ Hybridization - FISH) để phát hiện một số bất thường số lượng, cấu trúc ở mức độ nhiễm sắc thể (NST) phục vụ chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh di truyền/hội chứng bệnh.

Kỹ thuật FISH từ tế bào ối thường được chỉ định trong các trường hợp sau:

- Thai có nguy cơ cao với các bệnh, hội chứng do bất thường số lượng NST: hội chứng Down, hội chứng Patau, hội chứng Edwards.

- Thai có nghi ngờ mắc các bệnh, hội chứng do bất thường cấu trúc NST dạng vi mất đoạn, lặp đoạn NST: hội chứng DiGeorge, hội chứng Prader Willi, hội chứng Williams, hội chứng lặp đoạn NST 22, lặp đoạn NST 15 hoặc các bất thường khác trên NST... Hoặc các trường hợp có nhu cầu cần làm xét nghiệm này.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật FISH là kỹ thuật di truyền dựa trên phân tích các tín hiệu huỳnh quang của các vùng NST, các gen, tổ hợp gen trong một tế bào. So sánh số lượng tín hiệu, màu sắc tín hiệu với tín hiệu trên tế bào bình thường theo quy định của hãng sản xuất các đầu dò. Từ đó đánh giá được bất thường số lượng NST dạng: đa bội, thiếu bội, lệch bội và các bất thường cấu trúc NST: mất đoạn, lặp đoạn, chuyển đoạn, khuếch đại.

1.2.2. Nguyên lý

Nguyên lý kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ FISH (Fluorescent In-situ Hybridization) dựa trên nguyên tắc lai bổ sung giữa đầu dò huỳnh quang và trình tự DNA đích trong nhân tế bào. Các đầu dò huỳnh quang có kích thước từ 20 bp đến 1000 bp, đầu dò huỳnh quang có thể được đánh dấu vào vùng tận cùng của NST, tâm NST, các vùng gen đặc hiệu. Phân tích các tín hiệu huỳnh quang bằng hệ thống kính hiển vi huỳnh quang để phát hiện các dạng bất thường NST về số lượng và cấu trúc.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Chai nuôi cấy có ống thông khí;
- Chai thủy tinh 250mL, 500mL;
- Cốc thủy tinh;
- Ống ly tâm nhọn 15mL;
- Pipet nhựa vô trùng 10mL, 3mL;
- Đầu côn có phin lọc 1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L;
- Đĩa petri 35mm;
- Đĩa petri thủy tinh;
- Lam kính SuperFrost hoặc xử lý polysine;
- Lamen phủ 22x22mm; 18x18mm;
- khay đựng ống 2mL, 15 mL, khay đựng đĩa nuôi cấy.

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Hóa chất dùng chung: nước cất 2 lần; 100% ethanol.
- Ống đựng mẫu vô trùng 15mL, găng tay; khẩu trang; mũ giấy; bông cotton; băng dính; văn phòng phẩm (giấy chỉ định, giấy hẹn trả kết quả xét nghiệm); giấy in tem, mực in tem; sát khuẩn tay nhanh; quần áo nhân viên lấy mẫu, nhân viên thực hiện xét nghiệm.
- Hóa chất nuôi cấy: sử dụng môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh là môi trường được bổ sung hóa chất cần thiết (Fetal Bovine Serum (FBS), L-glutamine và PHA...) để tối ưu hóa sự bám dính và phát triển của tế bào.
- Hóa chất thu hoạch tế bào: trypsin EDTA 1X, Colcemid, Acid acetic, Methanol, KCl
- Hóa chất lai: đầu dò huỳnh quang; thuốc nhuộm huỳnh quang (DAPI II counterstain...); dung dịch đệm lai; SSC 20x; NP 40.
- Hóa chất phân tích: dầu soi kính

2.3. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II; tủ nuôi cấy tế bào 37°C, 5% CO₂; tủ hút mùi hóa chất độc hại;
- Tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C; -40°C; -80°C ...).
- Hệ thống kính hiển vi chụp và phân tích công thức nhuộm sắc thể tự động miễn dịch huỳnh quang, phần mềm phân tích NST Karyotyping
- Kính hiển vi quang học; kính hiển vi soi ngược
- Máy li tâm thường; máy lai nhiệt.
- Pipet aid 5-50mL); Pipets (200 µL và 1000 µL...); Pipet Spenser (10 mL, 25mL...).
- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; máy hút dịch, nồi khử trùng ướ; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: tế bào dịch ối.
- Mẫu bệnh phẩm sử dụng có thể là cặn tế bào sau khi nuôi cấy hoặc sau khi thu hoạch trực tiếp.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.
- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: Kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

9 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học.
- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung các bước thực hiện xét nghiệm.
- + Khay đựng mẫu nuôi cấy.
- + Khay chai nuôi cấy thu hoạch.
- + Bút các loại.

+ Găng tay, cồn tuyệt đối và cồn 70°C, sát khuẩn tay nhanh, đăng kí sử dụng tủ an toàn sinh học, tủ ấm CO₂, máy li tâm, bể ổn nhiệt, tủ ẩm.

+ Hóa chất cần dùng cho mỗi lần thực hiện quy trình: đảm bảo số lượng, hạn sử dụng, điều kiện bảo quản.

+ Các biểu mẫu theo dõi thực hiện quy trình.

4.1.1. Nuôi cấy tế bào sử dụng cho kỹ thuật Metaphase FISH

- Thực hiện tất cả các thao tác trong tủ an toàn sinh học cấp II. Ghi đầy đủ thông tin vào phiếu theo dõi sử dụng tủ an toàn sinh học cấp II

- Bật tủ theo đúng trình tự quy định, chạy khởi động trong 5 phút, vệ sinh bề mặt tủ an toàn sinh học cấp II bằng cồn 70°C, sau đó là dung dịch làm sạch và khử khuẩn bề mặt dùng trong y tế.

- Điền đầy đủ thông tin của người bệnh và kiểm tra chất lượng mẫu vào trong phiếu theo dõi thực hành.

- Các bước thực hiện quy trình nuôi cấy các loại tế bào thực hiện theo quy trình “Xét nghiệm công thức Nhiễm sắc thể (Karyotype) tế bào dịch ối; tế bào gốc trung mô”.

4.1.2. Chuẩn bị mẫu tế bào sử dụng cho kỹ thuật Interphase FISH

- Chuẩn bị phiếu theo dõi thực hiện nuôi cấy, thu hoạch tế bào.

- Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm.

- Ghi nhãn mã số phòng xét nghiệm, tên người bệnh để dán ống đựng mẫu thu hoạch.

- Pha dung dịch nhược trương (KCl nồng độ 0,56g/mL).

- Làm ấm dung dịch Trypsin 1X.

- Pha dung dịch cố định tế bào (CRNAoy: 3 methanol/1 acid acetic).

- Chuẩn bị tiêu bản sạch.

- Các bước thực hiện:

+ Trước thu hoạch 30 phút:

* Làm ấm dung dịch Trypsin 1X (6 mL/mẫu) và KCl 0,075M (8 mL/mẫu) tại 37°C.

* Chuẩn bị tối thiểu 50 mL dung dịch CRNAoy.

+ Trộn đều và hút 200 mL mẫu máu ngoại vi sau xử lý trypsin ở bước trên chuyển vào ống ly tâm 15 mL, bổ sung 8 mL dung dịch KCl 0,075M đã làm ấm và ủ tại 37°C trong 30 phút.

+ Sau ủ, bổ sung 2 mL dung dịch CRNAoy để làm dừng quá trình nhuộm trương. Ly tâm 1800 vòng/phút, loại bỏ dịch nổi và giữ lại cặn.

+ Bổ sung 7 mL dung dịch CRNAoy, ly tâm 1800 vòng/phút, loại bỏ dịch nổi và giữ lại cặn. Lặp lại 2-3 lần.

+ Sau lần ly tâm cuối, loại bỏ dịch nổi đến 50 mL. Trộn đều cặn tế bào.

4.1.3. Tạo tiêu bản

- Chuẩn bị 1 tiêu bản có xử lý polysine cho 1 người bệnh, ghi nhãn tiêu bản (mã số PXN, tên người bệnh, đầu dò).

- Đánh dấu vùng lai bằng bút dạ đen và bút kim cương.

- Nhỏ 7-10 μ L cặn tế bào sau thu hoạch theo chiều thẳng đứng vào vùng lai đã đánh dấu.

- Kiểm tra mật độ và chất lượng tế bào dưới kính hiển vi soi ngược. Nếu quan sát được từ 15-20 tế bào trong 1 vi trường thì vùng lai đạt tiêu chuẩn. Nếu mật độ tế bào ít hơn thì cần phun thêm cho đến khi đạt tiêu chuẩn. Nếu mật độ tế bào quá dày (~50 tế bào/ vi trường) thì cần pha loãng cặn tế bào (cho thêm dung dịch canroy vào cặn tế bào) và phun lại vùng lai khác.

4.1.4. Lai huỳnh quang

a. Chuẩn bị:

- Ngâm 2 thanh ảm vào nước trong 5 phút và lắp vào máy lai.

- Làm tan đầu dò và đệm ở nhiệt độ phòng, ly tâm nhanh 1-3 phút.

- Hai pipet: 01 pipet 0,5-2 μ L và 01 pipet 10 μ L.

- Hai loại đầu côn có lọc 10 μ L chống dính và không chống dính.

- Lamen 18x18 mm.

b. Thực hiện:

- Chuẩn bị đầu dò: nhỏ lần lượt đầu dò và dung dịch đệm lên lamen 18x18 mm theo hướng dẫn của nhà sản xuất, trộn đều bằng pipet.

- Úp phần vùng tế bào đã đánh dấu trên tiêu bản vào lamen chứa hỗn hợp đầu dò, đuổi hết bong bóng (nếu có) và cố định lamen bằng keo cao su.

- Đặt tiêu bản vào máy lai nhiệt, chọn chu trình lai phù hợp.

4.1.5. Rửa sau lai

a. Chuẩn bị: Chuẩn bị 3 cốc nhựa hoặc thủy tinh chịu nhiệt:

+ Cốc 1: 100 mL dung dịch SSX 2X, bổ sung 300 μ L NP40, để trong bể ổn nhiệt 75°C.

+ Cốc 2: 100 mL dung dịch SSX 2X, bổ sung 300 μ L NP40, để ở nhiệt độ phòng.

+ Cốc 3: 100 mL nước cất, để ở nhiệt độ phòng.

+ Đồng hồ bấm giây.

+ Pipet 10 μ L.

b. Thực hiện:

- Tắt điện phòng, tránh ánh sáng trong quá trình rửa lam.

- Lấy tiêu bản ra khỏi máy lai, bóc keo cao su và loại bỏ lamen.

- Rửa tiêu bản trong coóng 1 tại 75°C trong 3 phút.

- Rửa tiếp tiêu bản trong coóng 2 tại nhiệt độ phòng trong 2 phút.

- Rửa nhanh tiêu bản trong vài giây ở coóng 3 và để tiêu bản khô tự nhiên tại nhiệt độ phòng.

+ Nhỏ 7 μ L DAPI vào vùng tế bào lai đầu dò đã đánh dấu trên tiêu bản.

+ Phủ lamen 22x22 mm lên vùng đánh dấu, đuổi bọt khí và cố định lamen bằng sơn móng tay.

+ Cất tiêu bản vào khay và giữ trong ngăn đá tủ lạnh khoảng 2-3 phút đến khi phân tích kết quả.

4.1.6. Phân tích kết quả

- Phân tích trên kính hiển vi huỳnh quang được thực hiện độc lập bởi 2 kỹ thuật y.

- Tìm vi trường trên tiêu bản ở vật kính 10x với bộ lọc màu DAPI.

- Khi đã xác định được vi trường, chuyển sang vật kính dầu 100x, nhỏ dầu và dùng nút vi cấp lấy nét của vi trường ở độ phóng đại mới.

- Di chuyển tiêu bản theo một hướng nhất định (ví dụ: từ trái sang phải, từ trên xuống dưới). Khi thấy tế bào, quan sát các tín hiệu khác nhau bằng cách chuyển các bộ lọc, đếm số lượng tín hiệu quan sát được. Ghi số lượng tín hiệu vào phiếu phân tích kết quả FISH.

- Chụp lại hình ảnh tế bào bằng phần mềm phân tích tín hiệu huỳnh quang.

- Khi đã phân tích đủ số lượng, đưa ra kết luận cuối cùng và làm báo cáo trả kết quả.

4.2. Nhận định kết quả

- Xem xét mẫu nội kiểm chất lượng: mẫu nội kiểm trong tất cả các bước thực hiện quy trình đạt.

- Phân tích nhận định kết quả: so sánh số lượng, màu sắc, cách biểu hiện tín hiệu huỳnh quang với tín hiệu chuẩn của nhà sản xuất.

- Phiên giải và báo cáo kết quả: khi đã phân tích đủ số lượng, đưa ra kết luận người bệnh có mang các bất thường NST hay không.

- Nội dung báo cáo kết quả và lưu báo cáo theo quy định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu trữ theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm (yếu tố nhiễu) và các phản ứng chéo, các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm: nhiễm tế bào mẹ trong dịch ối.

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật: thực hiện lại quy trình kỹ thuật.

- Hóa chất hết hạn sử dụng và không được bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất hoặc không được trộn đều trước khi chia sang các ống nhỏ hoặc trước khi hút.

- Nhiễm trùng: lấy lại mẫu, và tiến hành lại quy trình kỹ thuật.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật: tiến hành lại xét nghiệm.

- Phân tích kết quả không chính xác: kiểm tra và phân tích chéo kết quả xét nghiệm hoặc xin ý kiến của bác sĩ lâm sàng.

- Mẫu chứng nội kiểm không có kết quả: cấy lại hoặc thay mẫu chứng khác.

- Báo cáo sai kết quả xét nghiệm: thông báo tới lãnh đạo khoa xét nghiệm và sửa lại kết quả xét nghiệm.

- Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả: báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

6.1. Nuôi cấy tế bào

- Thử tích môi trường, thử tích mẫu bệnh phẩm đảm bảo đúng theo quy trình.

- Chất lượng mẫu sau nuôi cấy được đánh giá bằng quan sát: môi trường trong, không vẩn đục, không thay đổi màu sắc, khi môi trường chuyển đục hay lẫn máu là những chai nuôi cấy có nguy cơ nhiễm trùng.

- Chai nuôi cấy nội kiểm không nhiễm trùng.

6.2. Thu hoạch tế bào sau nuôi cấy hoặc thu hoạch tế bào trực tiếp

- Chất lượng tế bào tế bào dịch ối sau nuôi cấy đạt tiêu chuẩn thu hoạch khi soi trên kính hiển vi soi ngược quan sát được trên bề mặt chai nuôi cấy có 4-5 clone tế bào bám dính.

- Giá trị báo động/nguy hiểm: nếu số lượng cụm tế bào NST <10 tế bào/vi trường thì tiêu bản không đạt chất lượng.

- Cách xử lý nếu chất lượng mẫu thu hoạch sau nuôi cấy hoặc thu hoạch trực tiếp: ly tâm lại cặn tế bào, tạo tiêu bản và kiểm tra lại hoặc thực hiện lại quy trình.

6.3. Lai huỳnh quang

- Chất lượng tín hiệu rõ ràng, đủ tiêu chuẩn nhận định

- Hóa chất được bảo quản theo các khuyến cáo của nhà sản xuất.

6.4. Phân tích tín hiệu huỳnh quang

- Tiêu chuẩn phân tích:

+ Mỗi người bệnh được phân tích bởi hai nhân viên độc lập

+ Tín hiệu huỳnh quang rõ ràng, sắc nét

+ Đảm bảo đủ số tế bào được phân tích, phù hợp với chỉ định của người bệnh.

- Đối với kỹ thuật Metaphase FISH: số lượng tế bào phân tích tối thiểu 10 tế bào, nếu phát hiện tình trạng khảm tăng số lượng tế bào phân tích là 30 tế bào.

- Đối với kỹ thuật Interphase FISH: số lượng tế bào phân tích tối thiểu là 50 tế bào, nếu phát hiện tình trạng khảm tăng số lượng tế bào phân tích là 100 tế bào.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jean McGowan-Jordan, Ottawa, ON Ros J. Hastings.2020. An international system for human cytogenomic nomenclature (ISCN). Karger
2. Marilyn S Arsham, Margaret J Barch, and Helen J. Lawce; The AGT cytogenetics laboratory manual; 4; The organization for cytogenetics and molecular professionals; Chromosome stain, 235-238
3. Leversha M, Sinfield C and Webb G; Rapid and reliable methods for the G and C banding of Human Chromosomes; Aust J Med Lab Sci 1; 139-143
4. Mireille Claustres¹, Viktor Koz'ich², Els Dequeker³ et al. 2014. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing. European Journal of Human Genetics 22, 160-170
5. Trần Đức Phần, Lương Thị Lan Anh và cs.2021. Di truyền y học. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

5. XÉT NGHIỆM CÔNG THỨC NHIỄM SẮC THỂ (KARYOTYPE) TẾ BÀO MÁU NGOẠI VI; TỦY XƯƠNG; TẾ BÀO MÔ KHÁC

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm nhiễm sắc thể (Karyotype) để phát hiện các bất thường số lượng hoặc cấu trúc nhiễm sắc thể (NST) phục vụ chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật công thức nhiễm sắc thể (Karyotype) là kỹ thuật di truyền dựa trên việc phân tích bộ NST trong 1 tế bào. So sánh bộ NST của người bệnh với bộ NST chuẩn của người về số lượng, kích thước, độ phân giải băng để đánh giá những bất thường số lượng NST dạng: đa bội, thiếu bội, lệch bội và các bất thường cấu trúc NST dạng: chuyển đoạn, mất đoạn, lặp đoạn, đảo đoạn, NST hình vòng, NST marker.

1.2.2. Nguyên lý

Mẫu tế bào máu ngoại vi hoặc tủy xương được nuôi cấy với môi trường nuôi cấy phù hợp trong thời gian 24-72h. Đối với môi trường nuôi cấy tế bào máu ngoại vi có bổ sung PHA (phytohemagglutinin) gây tăng khả năng phân bào của tế bào Lympho T. Đối với mẫu bệnh phẩm tủy xương trong các bệnh lý tăng sinh ác tính tế bào tủy, bản chất là các tế bào non có sự tăng sinh mạnh mẽ nên trong môi trường nuôi cấy không cần bổ sung PHA. Sau nuôi cấy, tế bào được tiếp xúc với chất dừng nguyên phân khi đó sẽ thu được các NST ở kỳ giữa. NST lúc này giãn xoắn tối đa là giai đoạn tối ưu để quan sát hình thái, cấu trúc.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

Chai nuôi cấy có ống thông khí; Chai thủy tinh 250mL, 500mL; Cốc thủy tinh; Ống ly tâm nhọn 15mL; Pipet nhựa vô trùng 10mL, 3mL; Đầu côn có phin lọc 1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L; Lam kính; Lamen phủ 24x50mm; khay đựng ống 2mL, 15 mL, khay đựng chai nuôi cấy.

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Hóa chất dùng chung: nước cất 2 lần; 100% ethanol.
- Dụng cụ lấy mẫu: bơm tiêm 5 mL; ống đựng bệnh phẩm: ống chống đông Heparin, trang bị bảo hộ: găng tay; khẩu trang; mũ giấy; bông cotton; băng dính; văn phòng phẩm (giấy chỉ định, giấy hẹn trả kết quả xét nghiệm); sát khuẩn tay nhanh.

Hóa chất nuôi cấy:

+ Nuôi cấy tế bào máu ngoại vi: sử dụng môi trường được tối ưu hóa (bổ sung với Fetal Bovine Serum (FBS), L-glutamine và PHA...).

+ Nuôi cấy tế bào tủy xương: sử dụng môi trường được tối ưu hóa (bổ sung với Fetal Bovine Serum (FBS), L-glutamine và PHA...).

- Hóa chất thu hoạch tế bào: colcemid, đối với tế bào tủy xương: có thể sử dụng thêm hóa chất cần thiết trong quá trình thu hoạch để tăng số lượng cụm NST và tăng độ phân giải của băng NST (Ethidium Bromide...), Acid acetic, Methanol, KCl.

- Hóa chất nhuộm băng G: PBS, đệm Phosphat ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{:Na}_2\text{PO}_4$), Giemsa (pha 840 mL Glyxerin vào 10 g bột giemsa. Trộn đều trong 2 giờ, thêm 540 mL Methanol 100%, lọc và thu dung dịch Giemsa cần dùng), Trypsin 2,5%, Glycerin, Ethanol tuyệt đối, vật tư dùng để cố định lamen phủ trên tiêu bản, mực đích lưu giữ lam để kiểm tra lại kết quả phân tích khi cần (DPX moutant...), dầu soi kính.

2.3. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II; tủ nuôi cấy tế bào 37°C, 5% CO_2 ; tủ hút hóa chất độc hại.

- Hệ thống kính hiển vi chụp và phân tích công thức nhiễm sắc thể tự động miễn dịch huỳnh quang, phần mềm phân tích NST Karyotyping; Kính hiển vi quang học; Kính hiển vi soi ngược.

- Máy ly tâm (ống 15 mL 36 vị trí...).

- Pipet aid 5-50 mL; Pipets: 200 μ L và 1000 μ L; Pipet Spenser: 10 mL, 25 mL;

- Tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C; -40°C; -80°C...).

- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; máy hút dịch, nồi khử trùng ướt; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi; dịch tủy xương

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: thể tích 1,5-2 mL, đựng trong ống Heparin vô trùng.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.

- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

9 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học.

- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung các bước thực hiện xét nghiệm

- + Khay đựng mẫu nuôi cấy; khay chai nuôi cấy thu hoạch; bút các loại.

- + Rửa tay, cồn tuyệt đối và cồn 70°C, sát khuẩn tay nhanh, đăng kí sử dụng tủ an toàn sinh học, tủ ấm CO₂, máy ly tâm, bể ổn nhiệt, tủ ẩm.

- + Ghi tên người bệnh/ mã số trên ống đựng bệnh phẩm, ống ly tâm, chai nuôi cấy.

- + Hóa chất cần dùng cho mỗi lần thực hiện quy trình: đảm bảo số lượng, hạn sử dụng, điều kiện bảo quản.

- + Các biểu mẫu theo dõi thực hiện quy trình (nếu có).

4.1.1. Nuôi cấy tế bào

- Thực hiện tất cả các thao tác trong tủ an toàn sinh học cấp II. Ghi đầy đủ thông tin vào phiếu theo dõi sử dụng tủ an toàn sinh học cấp II.

- Bật tủ theo đúng trình tự quy định, chạy khởi động trong 5 phút, vệ sinh bề mặt tủ an toàn sinh học bậc II bằng cồn 70°C, sau đó là dung dịch làm sạch và khử khuẩn bề mặt dùng trong y tế.

+ Lắc đều chai môi trường nuôi cấy, chia 6 mL môi trường vào từng chai nuôi cấy 25 cm².

+ Dán nhãn ghi tên người bệnh, mã phòng xét nghiệm vào các chai nuôi cấy.

+ Sử dụng pipet để hút bệnh phẩm vào các chai nuôi cấy theo thể tích sau:

+ Mẫu máu ngoại vi: 500 μ L với người bệnh sơ sinh (<1 tháng) ($2,7-6 \times 10^6$ tế bào bạch cầu); 600 μ L với người bệnh trẻ lớn (> 1 tháng) ($2,7-6 \times 10^6$ tế bào bạch cầu)/1 chai nuôi cấy.

* Mẫu tủy xương: 500 μ L/1 chai nuôi cấy

+ Lắc đều chai cấy để hòa tan mẫu hoàn toàn vào môi trường, đặt chai cấy nằm ngang trên khay cấy.

+ Đặt khay cấy trong tủ nuôi cấy ở 37°C và 5% CO₂ trong 72h.

+ Vệ sinh bề mặt tủ an toàn sinh học bậc II bằng cồn 70°C, dung dịch làm sạch và khử khuẩn bề mặt dùng trong y tế và tắt tủ theo đúng trình tự quy định.

4.1.2. Thực hiện thu hoạch tế bào sau nuôi cấy

- Sau 72 giờ nuôi cấy tế bào máu và sau 24h đối với nuôi cấy tế bào tủy xương, thêm 80 μ L colcemid vào chai nuôi cấy (nồng độ 10 μ L colcemid/1mL). Lắc đều, để trong tủ cấy ở 37°C trong 90 phút.

- Sau thời gian xử lý colcemid, lấy mẫu từ tủ cấy và lắc nhẹ chai nuôi cấy để mẫu hòa tan hoàn toàn vào dung dịch. Đổ mẫu sang ống ly tâm 15 mL, dán tên người bệnh, mã số PXN.

- Ly tâm 1800 vòng/5 phút, loại bỏ dịch nổi, trộn đều cặn.

- Thêm 8 mL dung dịch nhược trương (KCl), ủ mẫu trong bể ổn nhiệt nước 37°C trong 35 phút, lắc mẫu 10 phút/lần.

- Thêm 3 mL dung dịch cố định tế bào (cRNAoy), trộn đều, ly tâm 1800 vòng/5 phút, loại bỏ dịch nổi, trộn đều cặn.

- Thêm 8 mL dung dịch CRNAoy và trộn đều, ly tâm 1800 vòng/5 phút, loại bỏ dịch nổi, trộn đều cặn. Lặp lại bước này thêm 2 lần.

- Thêm 8 mL dung dịch CRNAoy và trộn đều, ly tâm 1800 vòng/5 phút, loại bỏ dịch nổi, chỉ để lại khoảng 500 - 1000 μ L cận tế bào.

- Tạo tiêu bản (lam)

+ Nhỏ 50 μ L cận tế bào của mỗi mẫu người bệnh sau thu hoạch lên tiêu bản dò, đưa tiêu bản qua ngọn lửa đèn cồn từ 8-10 giây. Dán nhãn của đúng người bệnh lên tiêu bản.

+ Kiểm tra mật độ và chất lượng cụm nhiễm sắc thể của tiêu bản dò trên kính hiển vi soi ngược:

+ Tiêu bản dò đạt tiêu chuẩn chất lượng khi: có khoảng 10 - 15 cụm NST trong 1 vi trường ở độ phóng đại 100 lần.

* Hình thái nhiễm sắc thể dài vừa đủ, không quá ngắn.

* Các nhiễm sắc thể trong cụm không quá rải rác hay tập trung.

- Ghi vào phiếu theo dõi thực hiện nuôi cấy, thu hoạch và nhuộm tế bào máu ngoại vi. Nếu tiêu bản dò đã đạt tiêu chuẩn chất lượng thì chuẩn bị thêm từ 3 tiêu bản/người bệnh.

- Nếu tiêu bản dò chưa đạt tiêu chuẩn chất lượng thì cần điều chỉnh các yếu tố sau:

Bảng 3: Chất lượng tiêu bản dò và cách xử lý

Chất lượng tiêu bản dò	Cách xử lý
Không đủ cụm NST trên một vi trường	Tăng thể tích cận tế bào nhỏ lên 60-70 μ L
	Tăng slide
Lượng cụm NST quá nhiều trên một vi trường	Bổ sung thêm CRNAoy vào dung dịch cận tế bào để pha loãng cận
Cụm NST không bung	Tăng thời gian đưa tiêu bản qua ngọn lửa đèn cồn lên 10-12 giây hoặc rửa lại cận tế bào một lần nữa

- Làm già các tiêu bản đạt tiêu chuẩn ở 37°C trong 2-3 ngày hoặc 60°C qua đêm.

- Chuyển cận tế bào còn lại vào ống 2 mL, dán nhãn bao gồm mã số phòng xét nghiệm, tên người bệnh. Cận tế bào lưu giữ trong hộp ở 4-8°C trong vòng 3 tháng hoặc ở -80°C trong thời gian dài hơn. Cận tế bào được lưu giữ và hủy bỏ theo quy trình lưu giữ và thải bỏ mẫu bệnh phẩm.

- Vệ sinh bề mặt tủ hút bằng cồn 70°C, tắt tủ theo đúng quy định của nhà sản xuất.

4.1.3. Nhuộm băng

- Các bước thực hiện:

+ Nhúng tiêu bản vào cốc PBS trong bể ổn nhiệt 37°C

+ Bước 1: nhúng tiêu bản vào cốc trypsin, thời gian trypsin là 10 giây

+ Bước 2: rửa tiêu bản qua 2 cốc PBS ở nhiệt độ phòng

+ Bước 3: ngâm tiêu bản trong dung dịch Giemsa nhuộm 9 phút

+ Bước 4: rửa nhẹ dưới vòi nước và để khô

+ Kiểm tra chất lượng băng dưới kính hiển vi.

+ Chất lượng băng đạt yêu cầu khi đủ 400 băng của thang điểm đánh giá độ phân giải của băng G theo tổ chức di truyền học lâm sàng

* Nếu chất lượng băng chưa đạt yêu cầu cần tiến hành dò lại tiêu bản theo các bước từ 1-4 để xác định thời gian xử lý trypsin phù hợp. Nếu NST chưa cắt băng thì cần tăng thời gian xử lý trypsin lên 11 giây. Nếu NST bị cắt băng quá mức thì cần giảm thời gian xử lý trypsin xuống 9 giây.

* Nếu chất lượng băng đạt yêu cầu thì tiến hành nhuộm các tiêu bản còn lại theo các bước từ 1-4.

- Tiêu bản sau khi khô hoàn toàn được dán lamên 24x50 mm lên bề mặt bằng dung dịch DPX (nhỏ 2-3 giọt DPX lên bề mặt tiêu bản và phủ lamên lên trên, đuổi hết các bọt khí khỏi tiêu bản).

- Ghi vào phiếu theo dõi thực hiện nuôi cấy, thu hoạch và nhuộm tế bào.

4.1.4. Phân tích nhiễm sắc thể

- Mỗi mỗi bệnh phẩm cần được đếm và phân tích 20 cụm nhiễm sắc thể, trong đó ít nhất 3 cụm nhiễm sắc thể được lập karyotype.

- Trong trường hợp có dòng tế bào khác: Phân tích ít nhất 30 cụm NST.

- Không báo cáo kết quả với các trường hợp khả năng thấp (nếu phân tích 30 cụm NST có thể không báo cáo trường hợp khả năng <15%; nếu phân tích 50 cụm NST, có thể không báo cáo trường hợp khả năng <9%).

4.2. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả: thực hiện nội kiểm chất lượng theo quy trình nội kiểm chất lượng.

- Đọc và nhận định kết quả: so sánh kết quả phân tích nhiễm sắc thể của người bệnh với bộ nhiễm sắc thể của người bình thường. Căn cứ vào số lượng, kích thước và độ phân giải băng của nhiễm sắc thể đưa ra được kết luận người bệnh có mang bất thường nhiễm sắc thể bất thường về số lượng hoặc cấu trúc.

+ Sau khi hoàn thành phân tích, đưa ra kết luận về Karyotype, lựa chọn 1 cụm có chất lượng tốt nhất để báo cáo hình ảnh. Đối với các trường hợp thể khảm, in đủ số ảnh đại diện cho từng dòng tế bào. Yêu cầu về cụm NST làm báo cáo: các băng rõ ràng, các nhiễm sắc thể tách rời nhau, phản ánh đúng và trung thực kết quả bất thường.

+ Nội dung báo cáo kết quả của người bệnh sẽ được thực hiện theo quy định (gồm các trang kết quả: giấy chỉ định xét nghiệm (trang 1), báo cáo kết quả (trang 2) và báo cáo hình ảnh công thức nhiễm sắc thể (từ trang 3, 1 ảnh trong trường hợp kết quả Công thức NST dạng thuần, nhiều ảnh trong các trường hợp có bất thường NST dạng khảm)).

+ Báo cáo kết quả sẽ được lưu theo quy định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các Quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.
- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu trữ theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm (yếu tố nhiễu) và các phản ứng chéo, các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm: chất chống đông EDTA, người bệnh mới truyền máu hoặc các chế phẩm máu trong vòng 1 tháng...

- Nhầm lẫn mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật: thực hiện lại quy trình kỹ thuật.

- Hóa chất hết hạn sử dụng và không được bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất hoặc không được trộn đều trước khi chia sang các ống nhỏ hoặc trước khi hút: thay hóa chất mới.

- Nhiễm trùng: lấy lại mẫu, và tiến hành lại quy trình kỹ thuật.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật: tiến hành lại xét nghiệm.

- Phân tích kết quả không chính xác: kiểm tra và phân tích chéo kết quả xét nghiệm hoặc xin ý kiến của bác sĩ lâm sàng.

- Mẫu chứng nội kiểm không có kết quả: cấy lại hoặc thay mẫu chứng khác.

- Báo cáo sai kết quả xét nghiệm: thông báo tới lãnh đạo khoa xét nghiệm và sửa lại kết quả xét nghiệm.

- Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả: báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

6.1. Nuôi cấy tế bào

- Mật độ tế bào đạt $\geq 70\%$, nhiều tế bào kì giữa tròn sáng.

6.2. Thu hoạch tế bào sau nuôi cấy

Số lượng cụm tế bào ≥ 10 tế bào/ 1 vi trường

6.3. Nhuộm băng G

- Chất lượng băng NST đạt tiêu chuẩn theo quy định: đảm bảo số lượng băng 400-500 băng.

6.4. Phân tích nhiễm sắc thể

Hai nhân viên được đào tạo, có chứng chỉ chuyên môn, phân tích độc lập.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jean McGowan-Jordan, Ottawa, ON Ros J. Hastings.2020. An international system for human cytogenomic nomenclature (ISCN). Karger.

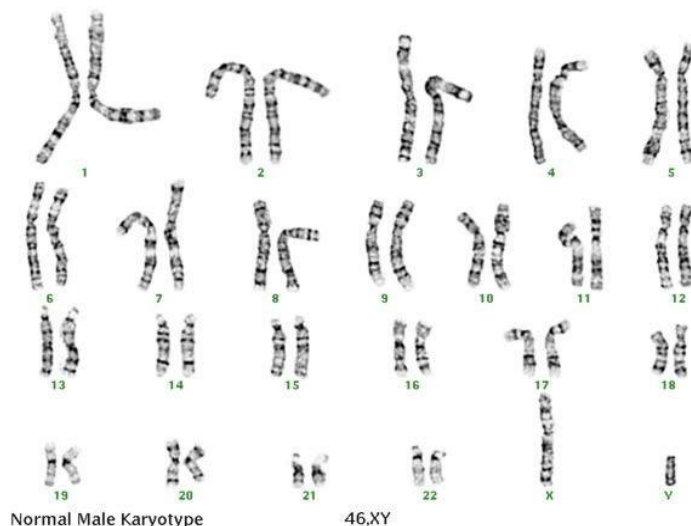
2. Marilyn S Arsham, Margaret J Barch, and Helen J. Lawce; The AGT cytogenetics laboratory manual; 4; The organization for cytogenetics and molecular professionals; Chromosome stain, 235-238.

3. Leversha M, Sinfield C and Webb G; Rapid and reliable methods for the G and C banding of Human Chromosomes; Aust J Med Lab Sci 1; 139-143
4. Mireille Claustres¹, Viktor Koz'ich², Els Dequeker³ et al. 2014. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing. European Journal of Human Genetics 22, 160-170
5. Trần Đức Phần, Lương Thị Lan Anh và cs. 2021. Di truyền y học. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
6. Susan Mahler Zneimer, Ph.D., FACMGG. Cytogenetic Abnormalities, Chromosomal, FISH and Microarray – Based Clinical Reporting. Willey Blackwell.

Phụ lục: Hướng dẫn lập Karyotype theo danh pháp quốc tế

- Nhận định bộ NST người:

Bộ nhiễm sắc thể của người bình thường bao gồm 22 cặp NST thường và 1 cặp NST giới tính với karyotype được viết dưới dạng: 46,XX ở người nữ hoặc 46,XY ở người nam. 46 NST người được xếp thành 7 nhóm, ký hiệu là A, B, C, D, E, F và G, theo vị trí của phần tâm.



Hình 2: Công thức nhiễm sắc thể của người nam bình thường

Nhóm A (NST 1,2,3): kích thước lớn nhất, cặp số 1: tâm giữa, cặp số 2: tâm lệch, cặp số 3: tâm giữa.

Nhóm B (NST 4,5): kích thước lớn và tương đồng về chiều dài và đều có tâm lệch.

Nhóm C có 7 cặp NST, bao gồm từ số 6 đến số 12: có kích thước trung bình, tâm lệch. NST X cũng được xếp vào nhóm này.

Nhóm D có 3 cặp NST số 13, 14 và 15 : kích thước trung bình, đều là NST tâm đầu, có vệ tinh gắn vào cánh ngắn.

Nhóm E có 3 cặp NST số 16, 17 và 18, các NST này tương đối ngắn. NST số 16 có tâm giữa, còn cặp số 17 và 18 có tâm lệch.

Nhóm F có 2 cặp NST số 19 và số 20: kích thước ngắn, tâm giữa.

Nhóm G có 2 cặp NST số 21 và số 22: kích thước ngắn, tâm đầu và có vệ tinh. NST Y cũng được xếp vào nhóm này, tuy nhiên NST Y không có vệ tinh.

- Thang điểm đánh giá độ phân giải băng G

Theo tổ chức di truyền học lâm sàng. Cụm NST có thể phân tích cần đảm bảo tối thiểu 400 băng theo tiêu chuẩn của tổ chức di truyền học lâm sàng.

Bảng 4: Thang điểm đánh giá độ phân giải của băng G theo tổ chức di truyền học lâm sàng

Độ phân giải băng	Tiêu chuẩn vùng đánh dấu
300 băng	2 băng tối trên 8p (8p12 và 8p22) 3 băng tối trên 10q (10q21,10q23,10q25) quan sát thấy 20p12, 22q12
400 băng	3 băng tối trên đoạn giữa cánh dài NST số 4 (4q22-q28) 3 băng tối trên đoạn giữa cánh dài NST số 5 (5q14, 5q21, 5q23) 2 băng tối trên 9p (9p21, 9p23) Thấy rõ 13q33
500 băng	Thấy rõ 7q33, 7q35 3 băng tối trên 11p (11p12, 11p14, 11p15.4) Thấy rõ 14q32.2 4 băng tối trên 18q (18q12.1, 18q12.3, 18q21.2, 18q22)
550 băng	Thấy rõ 5q31.2 8p21.2 có thể quan sát được 2 băng tối trên 11pter (11p15.2 và 11p15.4) Thấy rõ 22q13.2
700 băng	Vùng xa 2p25.2 Vùng xa 2q37.2 Phân tích được 10q21.1 và 10q21.3 Phân tích được 17q22-q24 vào vùng 3 băng tối

- Cách viết danh pháp quốc tế

- + Danh pháp quốc tế của các bất thường số lượng, bất thường cấu trúc và đa hình được viết đúng chuẩn của ISCN (*An international system for human cytogenomic nomenclature*).
- + Công thức nhiễm sắc thể được ghi như sau: [tổng số nhiễm sắc thể], [nhiễm sắc thể giới], [bất thường nhiễm sắc thể]. Nhiễm sắc thể thường chỉ được ghi khi có bất thường.
- + Ví dụ: 46,XX: Bộ NST nữ bình thường; 46,XY: Bộ NST nam bình thường

- + Bất thường số lượng NST dùng dấu + (tăng) hoặc - (giảm) viết trước NST để chỉ sự thay đổi số lượng NST, ví dụ: 47,XX,+21.
- + Bất thường số lượng NST giới được ghi như sau:
 - 45,X: Bộ NST chỉ có 1 NST X (hội chứng Turner)
 - 47,XXY: Bộ NST có 2 NST X và 1 NST Y (Hội chứng Klinefelter)
 - 47,XYY: Bộ NST có 1 NST X và 2 NST Y
 - 48,XXXY: Bộ NST có 3 NST X và 1 NST Y
- + Trong các bất thường NST thì NST giới bất thường được ghi đầu tiên, tiếp theo là các bất thường NST thường sắp xếp theo thứ tự NST từ 1->22, các bất thường viết cách nhau bằng dấu phẩy (,). Ví dụ: 47,X,i(X)(q10),+21.

Bảng 5: Một số kí hiệu thường dùng trong bất thường cấu trúc NST:

Ký hiệu	Ý nghĩa	Ví dụ
del	Deletion: mất đoạn	46,XX,del(5)(q13). Mất đoạn NST số 5, điểm đứt ở nhánh dài vùng 1, băng 3.
der	Derivative: bắt nguồn từ	46,XX,der(1)t(1;3)(p22;q13.1) NST số 1 bắt nguồn từ chuyển đoạn giữa NST số 1 và NST số 3
dn	Derivative de novo: NST phát sinh có nguồn gốc từ đột biến mới	46,XY,t(5;6)(q34;q23)mat,inv(14)(q12q31)dn: NST số 14 bị đảo đoạn là đột biến mới
dmat/ dpat	NST phát sinh có nguồn gốc từ mẹ/bố	46,XX,der(5)t(2;5)(q21;q31)dmat
dic	Dicentric: NST 2 tâm	45,XX,dic(13;15)(q22;q24) NST 2 tâm với chỗ đứt và nối lại ở băng 13q22 và 15q24
dup	Duplication: nhân đoạn	46,XX,dup(1)(q22q25) nhân 1 đoạn NST số 1 từ băng q22 đến băng q25
h	Heterochromatin: dị nhiễm sắc	16qh+ tăng chiều dài vùng dị nhiễm sắc trên nhánh dài NST 16
i	Isochromosome: NST đều	46,X,i(X)(q10) 1 NST X bình thường và 1 NST đều là nhánh dài NST X

Ký hiệu	Ý nghĩa	Ví dụ
ins	Insertion: chèn đoạn	46,XX,ins(2)(p13q21q31) đoạn nhánh dài giữa băng 2q21 với băng 2q31 đã được gắn vào nhánh ngắn ở vị trí băng 2p13
inv	Inversion: đảo đoạn	46,XX,inv(3)(q21q26) đảo đoạn ngoài tâm, NST đứt và nối lại ở vị trí 3q21 và 3q26
mar	Marker chromosome: NST đánh dấu	47,XX,+mar. Thêm 1 NST marker
pat	Paternal: nguồn gốc từ bố	46,XX,t(5;6)(q34q25)mat: Đột biến chuyển đoạn giữa NST số 5 và NST số 6 nhận từ mẹ. inv(14)(q12q31)pat: Đột biến đảo đoạn NST 14 nhận từ bố
mat	Maternal: nguồn gốc từ mẹ	
p/q	Nhánh ngắn/nhánh dài NST	
r	Ring chromosome: NST hình vòng tròn	46,XX,r(7)(p15q31) NST số 7 dạng vòng
rob	Robertsonian translocation: chuyển đoạn hòa nhập tâm	45,XX,rob(14;21)(q10;q10) hoặc 45,XX,der(14;21)(q10;q10): Điểm đứt và nối lại xảy ra ở tâm 14q10 và 21q10
s	Satellite: vệ tinh	21ps+ tăng chiều dài của vệ tinh trên nhánh ngắn NST 21
stk	Satellite stalk: thân vệ tinh	21pst+ tăng chiều dài của thân vệ tinh trên nhánh ngắn NST 21
t	Translocation: chuyển đoạn	46,XX,t(9;22)(q34;q11) chuyển đoạn giữa nhánh dài NST số 9 tại vị trí q34 và nhánh dài NST số 22 tại vị trí q11

6. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ TẾ BÀO MÁU NGOẠI VI; TỦY XƯƠNG; CÁC TẾ BÀO MÔ KHÁC BẰNG KỸ THUẬT FISH

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm nhiễm sắc thể tế bào máu ngoại vi; tế bào tủy xương bằng kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (Fluorescence In situ Hybridization - FISH) để phát hiện một số bất thường số lượng, cấu trúc ở mức độ nhiễm sắc thể (NST) phục vụ chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật FISH là kỹ thuật di truyền dựa trên phân tích các tín hiệu huỳnh quang của các vùng NST, các gen, tổ hợp gen trong một tế bào. So sánh số lượng tín hiệu, màu sắc tín hiệu với tín hiệu trên tế bào bình thường theo quy định của hãng sản xuất các đầu dò. Từ đó đánh giá được bất thường số lượng NST dạng: đa bội, thiếu bội, lệch bội và các bất thường cấu trúc NST: mất đoạn, lặp đoạn, chuyển đoạn, khuếch đại.

1.2.2. Nguyên lý

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ FISH (Fluorescent In-situ Hybridization) dựa trên nguyên lý bắt cặp các trình tự nhất định của người bệnh với đầu dò huỳnh quang theo nguyên tắc bổ sung. Các đầu dò huỳnh quang có kích thước từ 20 bp đến 1000 bp, đầu dò huỳnh quang có thể được đánh dấu vào vùng tận cùng của NST, tâm NST, các vùng gen đặc hiệu. Phân tích các tín hiệu huỳnh quang bằng hệ thống kính hiển vi huỳnh quang để phát hiện các dạng bất thường NST về số lượng và cấu trúc.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Chai nuôi cấy có ống thông khí; chai thủy tinh (250mL, 500mL...); cốc thủy tinh; ống ly tâm nhọn (15mL...); Pipet nhựa vô trùng (10mL, 3mL...).

- Đầu côn có phin lọc 1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L; Lam kính SuperFrost hoặc xử lý polysine; Lamen phủ 22x22mm; 18x18mm.

- Khay đựng ống các thể tích (2mL, 15 mL...), khay đựng chai nuôi cấy.

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Hóa chất dùng chung: nước cất 2 lần; 100% ethanol. Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- Ống đựng bệnh phẩm (ống đựng mẫu vô trùng chống đông Heparine...), găng tay; khẩu trang; mũ giấy; bông cotton; băng dính; văn phòng phẩm (giấy chỉ định, giấy hẹn trả kết quả xét nghiệm); sát khuẩn tay nhanh.

- Hóa chất nuôi cấy:

- + Nuôi cấy tế bào máu ngoại vi: sử dụng môi trường được bổ sung chất tối ưu hóa (bổ sung với FBS Bovine Serum (FBS), L-glutamine và PHA).

- + Nuôi cấy tế bào tủy xương: sử dụng môi trường được bổ sung chất tối ưu hóa (bổ sung với FBS Bovine Serum (FBS), L-glutamine và PHA).

- Hóa chất thu hoạch tế bào:

- + Trypsin EDTA 1X: Rã đông ở 37°C, chia nhỏ vào các ống ly tâm 15mL vô trùng (13 mL/ống) và lưu giữ ở -20°C. Rã đông lần nữa ở 37°C trước khi sử dụng và bảo quản ở -4°C nếu chưa dùng hết.

- + Colcemid: bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Đối với tế bào tủy xương: có thể sử dụng thêm hóa chất cần thiết trong quá trình thu hoạch để tăng số lượng cụm NST (Ethidium bromide...).

- + Acid acetic; Methanol; KCl.

- Hóa chất lai

- + Dầu dò huỳnh quang.

- + Thuốc nhuộm huỳnh quang (DAPI II counterstain...).

- + Dung dịch đệm lai (LSI...); SSC 20x; NP 40; dầu soi kính.

2.3. Trang thiết bị

- Tủ an toàn sinh học cấp II; tủ hút mùi hóa chất độc hại.

- Tủ nuôi cấy tế bào 37°C, 5% CO₂.

- Hệ thống kính hiển vi chụp và phân tích công thức nhiễm sắc thể tự động miễn dịch huỳnh quang, phần mềm phân tích (FISH ISIS...); kính hiển vi soi ngược.

- Máy ly tâm thường.

- Pipet các thể tích: 5-50mL; 0,5-10 μ L, 2-20 μ L và 200-1000 μ L; 10 mL, 25 mL.

- Máy lai nhiệt, tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C; -40°C; -80°C...).

- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; máy hút dịch, nồi khử trùng ướt; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh; máy in tem mã vạch.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: tế bào máu ngoại vi, tế bào tủy xương.

- Mẫu bệnh phẩm sử dụng có thể là cấy tế bào sau khi nuôi cấy hoặc sau khi thu hoạch trực tiếp.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.

- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

5,6 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học.

- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung các bước thực hiện xét nghiệm

- + khay đựng mẫu nuôi cấy; khay chai nuôi cấy thu hoạch; bút các loại

- + Găng tay, cồn tuyệt đối và cồn 70°C, sát khuẩn tay nhanh, đăng kí sử dụng tủ an toàn sinh học, tủ ấm CO₂, máy li tâm, bể ổn nhiệt, tủ ẩm, ...

- + Hóa chất cần dùng cho mỗi lần thực hiện quy trình: đảm bảo số lượng, hạn sử dụng, điều kiện bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất và yêu cầu của quy trình xét nghiệm.

- + Các biểu mẫu theo dõi thực hiện quy trình (nếu có).

4.1.1. Nuôi cấy tế bào sử dụng cho kỹ thuật Metaphase FISH

- Thực hiện tất cả các thao tác trong tủ an toàn sinh học cấp II. Ghi đầy đủ thông tin vào phiếu theo dõi sử dụng tủ an toàn sinh học cấp II

- Bật tủ theo đúng trình tự quy định, chạy khởi động trong 5 phút, vệ sinh bề mặt tủ an toàn sinh học bậc II bằng cồn 70°C, sau đó là dung dịch làm sạch và khử khuẩn bề mặt dùng trong y tế.

- Điền đầy đủ thông tin của người bệnh và kiểm tra chất lượng mẫu vào trong phiếu theo dõi thực hành (nếu có).

- Các bước thực hiện quy trình nuôi cấy các loại tế bào thực hiện theo quy trình “Xét nghiệm công thức Nhiễm sắc thể (Karyotype) máu ngoại vi; tủy xương”. Mẫu bệnh phẩm sau khi thu hoạch theo quy trình, thu được cấy tế bào sử dụng cho kỹ thuật Metaphase FISH.

4.1.2. Thu hoạch tế bào sử dụng cho kỹ thuật Interphase FISH

- Pha dung dịch nhược trương (nồng độ 0,56 g/mL).

- Làm ấm dung dịch Trypsin 1X.

- Pha dung dịch cố định tế bào (tỷ lệ 3 methanol/1 acid acetic).

- Chuẩn bị tiêu bản sạch.

- Trước thu hoạch 30 phút: làm ấm dung dịch Trypsin 1X (6 mL/mẫu) và KCl 0,075M (8 mL/mẫu) tại 37°C. Chuẩn bị tối thiểu 50 mL dung dịch CRNAoy theo tỷ lệ 3 thể tích Methanol với 1 thể tích Acid Acetic.

- Trộn đều và hút 200 mL mẫu máu ngoại vi sau xử lý trypsin ở bước trên chuyển vào ống ly tâm 15 mL, bổ sung 8 mL dung dịch KCl 0,075M đã làm ấm và ủ tại 37°C trong 30 phút.

- Sau ủ, bổ sung 2 mL dung dịch CRNAoy để làm dừng quá trình nhược trương. Ly tâm 1800 vòng/phút, loại bỏ dịch nổi và giữ lại cặn.

- Bổ sung 7 mL dung dịch CRNAoy, ly tâm 1800 vòng/phút, loại bỏ dịch nổi và giữ lại cặn. Lặp lại 2-3 lần..

- Sau lần ly tâm cuối, loại bỏ dịch nổi đến 50 mL, trộn đều cặn tế bào.

4.1.3. Tạo tiêu bản

- Chuẩn bị 1 tiêu bản có xử lý polysine cho 1 người bệnh.

- Ghi nhãn tiêu bản: mã số PXN, tên người bệnh, đầu dò.

- Đánh dấu vùng lai bằng bút dạ đen và bút kim cương.

- Nhỏ 7-10 μ L cặn tế bào sau thu hoạch theo chiều thẳng đứng vào vùng lai đã đánh dấu.

- Kiểm tra mật độ và chất lượng tế bào dưới kính hiển vi soi ngược. Nếu quan sát được từ 15-20 tế bào trong 1 vi trường thì vùng lai đạt tiêu chuẩn. Nếu

mật độ tế bào ít hơn thì cần phun thêm cho đến khi đạt tiêu chuẩn. Nếu mật độ tế bào quá dày (~50 tế bào/ vi trường) thì cần pha loãng cấy tế bào (cho thêm dung dịch canroy vào cấy tế bào) và phun lại vùng lai khác.

4.1.4. Lai huỳnh quang

- Ngâm 2 thanh ẩm vào nước trong 5 phút và lắp vào máy lai.
- Làm tan đầu dò và đệm ở nhiệt độ phòng, ly tâm nhanh 1-3 phút .
- Chuẩn bị: hai pipet (01 pipet 0,5-2 μ L và 01 pipet 10 μ L); hai loại đầu côn có lọc 10 μ L, chống dính và không chống dính; Lamen 18x18 mm.
- Nhỏ lần lượt đầu dò và dung dịch đệm lên lamen 18x18 mm theo hướng dẫn của nhà sản xuất, trộn đều bằng pipet.
- Úp phần vùng tế bào đã đánh dấu trên tiêu bản vào lamen chứa hỗn hợp đầu dò, đuổi hết bóng khí (nếu có) và cố định lamen bằng keo cao su.
- Đặt tiêu bản vào máy lai nhiệt, chọn chu trình lai phù hợp.

4.1.5. Rửa sau lai

a. Chuẩn bị:

- Chuẩn bị 3 cốc nhựa hoặc thủy tinh chịu nhiệt:
 - + Cốc 1: 100 mL dung dịch SSX 2X, bổ sung 300 μ L NP40, để trong bể ổn nhiệt 75°C
 - + Cốc 2: 100 mL dung dịch SSX 2X, bổ sung 300 μ L NP40, để ở nhiệt độ phòng
 - + Cốc 3: 100 mL nước cất, để ở nhiệt độ phòng
 - + Đồng hồ bấm giây; Pipet 1-10 μ L

b. Thực hiện

- Tắt điện phòng, tránh ánh sáng trong quá trình rửa lam
- Lấy tiêu bản ra khỏi máy lai, bóc keo cao su và loại bỏ lamen
- Rửa tiêu bản trong coóng 1 tại 75°C trong 3 phút.
- Rửa tiếp tiêu bản trong coóng 2 tại nhiệt độ phòng trong 2 phút
- Rửa nhanh tiêu bản trong vài giây ở coóng 3 và để tiêu bản khô tự nhiên tại nhiệt độ phòng
- Nhỏ 7 μ L DAPI vào vùng tế bào lai đầu dò đã đánh dấu trên tiêu bản
- Phủ lamen 22x22 mm lên vùng đánh dấu, đuổi bọt khí và cố định lamen bằng sơn móng tay

- Cắt tiêu bản vào khay và giữ trong ngăn đá tủ lạnh khoảng 2-3 phút đến khi phân tích kết quả

4.1.6. Phân tích kết quả

- Phân tích trên kính hiển vi huỳnh quang, tìm vi trường trên tiêu bản ở vật kính 10x với bộ lọc màu DAPI

- Khi đã xác định được vi trường, chuyển sang vật kính dầu 100x, nhỏ dầu và dùng nút vi cấp lấy nét của vi trường ở độ phóng đại mới

- Di chuyển tiêu bản theo một hướng nhất định (ví dụ: từ trái sang phải, từ trên xuống dưới). Khi thấy tế bào, quan sát các tín hiệu khác nhau bằng cách chuyển các bộ lọc, đếm số lượng tín hiệu quan sát được. Ghi số lượng tín hiệu vào phiếu phân tích kết quả FISH.

- Chụp lại hình ảnh tế bào bằng phần mềm phân tích tín hiệu huỳnh quang.

- Khi đã phân tích đủ số lượng, đưa ra kết luận cuối cùng và làm báo cáo trả kết quả.

4.2. Nhận định kết quả

- Xem xét mẫu nội kiểm: mẫu nội kiểm chất lượng trong tất cả các bước thực hiện quy trình đạt yêu cầu.

- Phân tích nhận định kết quả: so sánh số lượng, màu sắc, cách biểu hiện tín hiệu huỳnh quang với tín hiệu chuẩn của nhà sản xuất.

- Phiên giải và báo cáo kết quả: khi đã phân tích đủ số lượng, đưa ra kết luận người bệnh có mang các bất thường NST hay không.

- Nội dung báo cáo kết quả, lưu kết quả xét nghiệm được thực hiện theo quy định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

- Hồ sơ xét nghiệm được lưu theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm (yếu tố nhiễu) và các phản ứng chéo, các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm: chất chống đông EDTA, người bệnh mới truyền máu hoặc các chế phẩm máu trong vòng 1 tháng...

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật: thực hiện lại quy trình kỹ thuật.

- Hóa chất hết hạn sử dụng và không được bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất hoặc không được trộn đều trước khi chia sang các ống nhỏ hoặc trước khi hút.

- Nhiễm trùng: lấy lại mẫu, và tiến hành lại quy trình kỹ thuật.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật: tiến hành lại xét nghiệm.

- Phân tích kết quả không chính xác: kiểm tra và phân tích chéo kết quả xét nghiệm hoặc xin ý kiến của bác sĩ lâm sàng.

- Mẫu chứng nội kiểm không có kết quả: cấy lại hoặc thay mẫu chứng khác.

- Báo cáo sai kết quả xét nghiệm: thông báo tới lãnh đạo khoa xét nghiệm và sửa lại kết quả xét nghiệm.

- Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả: báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

6.1. Nuôi cấy tế bào

- Thể tích môi trường và mẫu bệnh phẩm đảm bảo đúng theo quy trình.

- Chất lượng mẫu sau nuôi cấy được đánh giá bằng quan sát: mẫu máu đỏ, tươi, không đông vón, không vẩn đục, không thay đổi màu sắc.

- Chai nuôi cấy nội kiểm không nhiễm trùng.

6.2. Thu hoạch tế bào sau nuôi cấy hoặc thu hoạch tế bào trực tiếp

- Chất lượng tế bào trước và sau nuôi cấy, đảm bảo vô trùng.

- Giá trị báo động/nguy hiểm: nếu số lượng cụm tế bào NST <10 tế bào/vi trường thì tiêu bản không đạt chất lượng.

- Cách xử lý nếu chất lượng mẫu thu hoạch sau nuôi cấy hoặc thu hoạch trực tiếp: ly tâm lại cặn tế bào, tạo tiêu bản và kiểm tra lại hoặc thực hiện lại quy trình.

6.3. Lai huỳnh quang

- Chất lượng tín hiệu rõ ràng, đủ tiêu chuẩn nhận định
- Hóa chất được bảo quản theo các khuyến cáo của nhà sản xuất.

6.4. Phân tích tín hiệu huỳnh quang

- Tiêu chuẩn phân tích:
 - + Mỗi người bệnh được phân tích bởi hai nhân viên độc lập
 - + Tín hiệu huỳnh quang rõ ràng, sắc nét
 - + Đảm bảo đủ số tế bào được phân tích, phù hợp với chỉ định của người bệnh.

- Đối với kỹ thuật Metaphase FISH: số lượng tế bào phân tích tối thiểu 10 tế bào, nếu phát hiện tình trạng khảm tăng số lượng tế bào phân tích là 30.

- Đối với kỹ thuật Interphase FISH: số lượng tế bào phân tích tối thiểu là 50, nếu phát hiện tình trạng khảm tăng số lượng tế bào phân tích là 100 tế bào.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jean McGowan-Jordan, Ottawa, ON Ros J. Hastings.2020. An international system for human cytogenomic nomenclature (ISCN). Karger.
2. Marilyn S Arsham, Margaret J Barch, and Helen J. Lawce; The AGT cytogenetics laboratory manual; 4; The organization for cytogenetics and molecular professionals; Chromosome stain, 235-238.
3. Leversha M, Sinfield C and Webb G; Rapid and reliable methods for the G and C banding of Human Chromosomes; Aust J Med Lab Sci 1; 139-143
4. Mireille Claustres¹, Viktor Koz'ich², Els Dequeker³ et al. 2014. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing. European Journal of Human Genetics 22, 160-170
5. Trần Đức Phấn, Lương Thị Lan Anh và cs. 2021. Di truyền y học. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

7. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ TRÊN TIÊU BẢN MÔ BẰNG KỸ THUẬT FISH

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

- Xét nghiệm nhiễm sắc thể (NST) trên tiêu bản mô bệnh học bằng kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (Fluorescence In situ Hybridization - FISH) để phát hiện một số bất thường số lượng, cấu trúc ở mức độ nhiễm sắc thể.

- Xét nghiệm FISH trên tiêu bản mô bệnh học thường được chỉ định trong các bệnh lý nghi ngờ có liên quan đến bất thường NST hoặc biến đổi gen, nhằm phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị.

- Mục đích nhằm phát hiện các bất thường NST đặc hiệu, khuếch đại gen, mất đoạn hoặc tái sắp xếp gen...

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật FISH là kỹ thuật di truyền dựa trên phân tích các tín hiệu huỳnh quang của các vùng NST, các gen, tổ hợp gen trong một tế bào. So sánh số lượng tín hiệu, màu sắc tín hiệu với tín hiệu trên tế bào bình thường theo quy định của hãng sản xuất các đầu dò. Từ đó đánh giá được bất thường số lượng NST dạng: đa bội, thiếu bội, lệch bội và các bất thường cấu trúc NST: mất đoạn, lặp đoạn, chuyển đoạn, khuếch đại.

1.2.2. Nguyên lý

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ FISH (Fluorescent In-situ Hybridization) dựa trên nguyên lý bắt cặp các trình tự nhất định của người bệnh với đầu dò huỳnh quang theo nguyên tắc bổ sung. Các đầu dò huỳnh quang có kích thước từ 20 bp đến 1000 bp, đầu dò huỳnh quang có thể được đánh dấu vào vùng tận cùng của NST, tâm NST, các vùng gen đặc hiệu. Phân tích các tín hiệu huỳnh quang bằng hệ thống kính hiển vi huỳnh quang để phát hiện các dạng bất thường NST về số lượng và cấu trúc.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Chai thủy tinh (250mL, 500mL...); cốc thủy tinh.
- Ống ly tâm nhọn 15mL; pipet nhựa vô trùng 10mL, 3mL; đầu côn có phin lọc 1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L.
- Lam kính (SuperFrost hoặc xử lý polysine); Lamen phủ 22x22mm; 18x18mm.
- Khay đựng ống 2mL, khay đựng mẫu u.

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Nước cất 2 lần; 100% ethanol.
- Ống đựng bệnh phẩm (ống đựng mẫu vô trùng, chống đông heparine...), găng tay; khẩu trang; mũ giấy; bông cotton; băng dính; văn phòng phẩm (giấy chỉ định, giấy hẹn trả kết quả xét nghiệm); sát khuẩn tay nhanh.
- Hóa chất lai: đầu dò huỳnh quang; thuốc nhuộm huỳnh quang (DAPI II counterstain); dung dịch đệm lai (LSI...), SSC 20x; NP 40.
- Dầu soi kính.

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống kính hiển vi chụp và phân tích công thức nhuộm sắc thể tự động miễn dịch huỳnh quang, phần mềm phân tích NST Karyotyping.
- Tủ hút mùi hóa chất độc hại; tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C; -40°C; -80°C).
- Máy ly tâm thường; máy lai nhiệt.
- Pipets (0,5-10 μ L, 2-20 μ L, 200-1000 μ L...); Pipet Spenser (10 mL, 25 mL...).
- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; máy hút dịch, nồi khử trùng ướt; tủ sấy khô; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Loại mẫu bệnh phẩm:

- Tiêu bản u tươi chưa qua cố định.
- Mảnh u được cố định bằng paraffin sau khi sinh thiết.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.
- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

9 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học.
- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung các bước thực hiện xét nghiệm
 - + khay đựng mẫu, bút các loại.
 - + Găng tay, cồn tuyệt đối và cồn 70°C, sát khuẩn tay nhanh, đăng kí sử dụng tủ an toàn sinh học, tủ ấm CO₂, máy li tâm, bể ổn nhiệt, tủ ẩm.
 - + Hóa chất cần dùng cho mỗi lần thực hiện quy trình: đảm bảo số lượng, hạn sử dụng, điều kiện bảo quản.
 - + Các biểu mẫu theo dõi thực hiện quy trình (nếu có).

4.1.1. Tạo tiêu bản trên mẫu u tươi

- Chuẩn bị 1 tiêu bản có xử lý polysine cho 1 người bệnh
- Ghi nhãn tiêu bản: mã số PXN, tên người bệnh, đầu dò
- Mẫu bệnh phẩm u có kích thước phù hợp 0,5-1cm/1 cạnh và tỉ lệ tế bào u tối thiểu 10 %, được cắt bằng máy cắt lạnh, độ dày lát cắt 2-5 micromet dàn lên lam.
- Lam được cố định trong dung dịch cố định tế bào (Metanol/acid acetic: 3/1) trong 15', sau đó để khô tự nhiên.
- Đánh dấu vùng lai bằng bút dạ đen và bút kim cương.

4.1.2. Tạo tiêu bản trên mẫu u nén

- Đặt coplinjar chứa dung dịch Pretreatment vào bể ổn nhiệt 95°C để làm ấm trước.
- Sử dụng lam Polysine, ghi rõ họ tên người bệnh, ngày tháng năm sinh, giới, Labcode.
- Mẫu bệnh phẩm u có kích thước phù hợp 0,5-1cm/1 cạnh và tỉ lệ tế bào u tối thiểu 10 %, được cắt bằng máy cắt block nén, độ dày lát cắt 2-5 micromet dàn lên lam.

- Đánh dấu vùng lai bằng bút dạ đen và bút kim cương.

4.1.3. Lai huỳnh quang

a. Chuẩn bị:

- Ngâm 2 thanh ẩ vào nước trong 5 phút và lắp vào máy lai;
- Làm tan đầu dò và đệm ở nhiệt độ phòng, ly tâm nhanh 1-3 phút;
- Hai pipet: 01 pipet 0,5-2 μL và 01 pipet 10 μL ;
- Hai loại đầu côn có lọc 10 μL chống dính và không chống dính;
- Lamen 18x18 mm.

b. Thực hiện:

- Chuẩn bị đầu dò: nhỏ lần lượt đầu dò và dung dịch đệm lên lamen 18x18 mm theo hướng dẫn của nhà sản xuất, trộn đều bằng pipet.
- Úp phần vùng tế bào đã đánh dấu trên tiêu bản vào lamen chứa hỗn hợp đầu dò, đuổi hết bong bóng (nếu có) và cố định lamen bằng keo cao su.
- Đặt tiêu bản vào máy lai nhiệt, chọn chu trình lai phù hợp

4.1.4. Rửa sau lai

a. Chuẩn bị:

- Chuẩn bị 3 cốc nhựa hoặc thủy tinh chịu nhiệt:
- + Cốc 1: 100 mL dung dịch SSX 2X, bổ sung 300 μL NP40, để trong bể ổn nhiệt 75°C
- + Cốc 2: 100 mL dung dịch SSX 2X, bổ sung 300 μL NP40, để ở nhiệt độ phòng.
- + Cốc 3: 100 mL nước cất, để ở nhiệt độ phòng.
- Đồng hồ bấm giây
- Pipet 10 μL

b. Thực hiện:

- Tắt điện phòng, tránh ánh sáng trong quá trình rửa lam
- Lấy tiêu bản ra khỏi máy lai, bóc keo cao su và loại bỏ lamen
- Rửa tiêu bản trong coóng 1 tại 75°C trong 3 phút.
- Rửa tiếp tiêu bản trong coóng 2 tại nhiệt độ phòng trong 2 phút
- Rửa nhanh tiêu bản trong vài giây ở coóng 3 và để tiêu bản khô tự nhiên tại nhiệt độ phòng
- Nhỏ 7 μL DAPI vào vùng tế bào lai đầu dò đã đánh dấu trên tiêu bản

- Phủ lamen 22x22 mm lên vùng đánh dấu, đuổi bọt khí và cố định lamen bằng sơn móng tay

- Cắt tiêu bản vào khay và giữ trong ngăn đá tủ lạnh khoảng 2-3 phút đến khi phân tích kết quả

4.1.5. Phân tích kết quả

- Phân tích trên kính hiển vi huỳnh quang
- Tìm vi trường trên tiêu bản ở vật kính 10x với bộ lọc màu DAPI
- Khi đã xác định được vi trường, chuyển sang vật kính dầu 100x, nhỏ dầu và dùng nút vi cấp lấy nét của vi trường ở độ phóng đại mới

- Di chuyển tiêu bản theo một hướng nhất định (ví dụ: từ trái sang phải, từ trên xuống dưới). Khi thấy tế bào, quan sát các tín hiệu khác nhau bằng cách chuyển các bộ lọc, đếm số lượng tín hiệu quan sát được. Ghi số lượng tín hiệu vào phiếu phân tích kết quả FISH.

- Chụp lại hình ảnh tế bào bằng phần mềm phân tích tín hiệu huỳnh quang.

- Khi đã phân tích đủ số lượng, đưa ra kết luận và làm báo cáo trả kết quả.

4.2. Nhận định kết quả

- Phân tích nhận định kết quả: so sánh số lượng, màu sắc, cách biểu hiện tín hiệu huỳnh quang với tín hiệu chuẩn của nhà sản xuất.

- Phiên giải và báo cáo kết quả: khi đã phân tích đủ số lượng, đưa ra kết luận người bệnh có mang các bất thường NST hay không.

- Nội dung báo cáo và lưu báo cáo thực hiện theo quy định.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu trữ theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm (yếu tố nhiễu) và các phản ứng chéo, các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm: lượng mô sinh thiết, vị trí mô sinh thiết, chất lượng đúc nền.

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật: thực hiện lại quy trình kỹ thuật.

- Hóa chất hết hạn sử dụng và không được bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất hoặc không được trộn đều trước khi chia sang các ống nhỏ hoặc trước khi hút.

- Nhiễm trùng: lấy lại mẫu, và tiến hành lại quy trình kỹ thuật.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật: tiến hành lại xét nghiệm.

- Phân tích kết quả không chính xác: kiểm tra và phân tích chéo kết quả xét nghiệm hoặc xin ý kiến của bác sĩ lâm sàng.

- Mẫu chứng nội kiểm không có kết quả: cấy lại hoặc thay mẫu chứng khác.

- Báo cáo sai kết quả xét nghiệm: thông báo tới lãnh đạo khoa xét nghiệm và sửa lại kết quả xét nghiệm.

- Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả: báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

6.1. Tạo tiêu bản

- Trước khi thực hiện quy trình:

- + Kiểm tra hạn sử dụng của các hóa chất.

- + Kiểm tra hoạt động của dụng cụ hỗ trợ pipet (pipet aid), các pipet vô trùng, các ống ly tâm vô trùng, chai nuôi cấy vô trùng, đầu côn vô trùng...

- + Kiểm tra sự vô trùng của trang thiết bị cần có sự khử trùng như: chai thủy tinh, pipet 10 mL, đảm bảo bao bì đóng gói khi khử trùng không bị rách, hở...

- Tiêu bản được tạo sau khi có kết quả hướng dẫn của kết quả giải phẫu bệnh, đảm bảo vùng lai trên tiêu bản là vùng chứa tế bào u.

6.2. Lai huỳnh quang

- Chất lượng tín hiệu rõ ràng, đủ tiêu chuẩn nhận định
- Hóa chất được bảo quản theo các khuyến cáo của nhà sản xuất.

6.3. Phân tích tín hiệu huỳnh quang

- Tiêu chuẩn phân tích:
 - + Mỗi người bệnh được phân tích bởi hai nhân viên độc lập
 - + Tín hiệu huỳnh quang rõ ràng, sắc nét
 - + Đảm bảo đủ số tế bào được phân tích, phù hợp với chỉ định của người bệnh.
- Đối với phân tích kỹ thuật FISH trên tiêu bản u: số lượng tế bào phân tích tối thiểu là 50 tế bào, nếu phát hiện tình trạng khả năng tăng số lượng tế bào phân tích là 100 tế bào.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jean McGowan-Jordan, Ottawa, ON Ros J. Hastings.2020. An international system for human cytogenomic nomenclature (ISCN). Karger.
2. Mireille Claustres¹, Viktor Koz'ich², Els Dequeker³ et al. 2014. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing. European Journal of Human Genetics 22, 160-170.
3. Trần Đức Phấn, Lương Thị Lan Anh và cs. 2021. Di truyền y học. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

8. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ THEO DÒNG TẾ BÀO BẰNG KỸ THUẬT FISH

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Kỹ thuật nhằm xác định các bất thường về số lượng hoặc cấu trúc của nhiễm sắc thể trong nhân tế bào theo từng dòng tế bào khác nhau (như dòng tuỷ, lympho, plasma...).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Xét nghiệm nhiễm sắc thể theo dòng tế bào được thực hiện trên nguyên lý của kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ - FISH (Fluorescent in-situ hybridization). Nguyên lý kỹ thuật dựa trên cơ sở của phản ứng lai DNA. Trong tế bào, phân tử DNA tồn tại dưới dạng phân tử kép gồm 2 chuỗi đơn gắn kết bổ sung với nhau thông qua liên kết hydro. Liên kết hydro là liên kết yếu nên dễ dàng bị đứt gãy dưới tác động của nhiệt độ hay pH cao. Lúc đó, phân tử DNA bị tách thành 2 sợi đơn. Tuy nhiên khi nhiệt độ hay pH thay đổi, liên kết hydro cũng nối lại nhanh chóng. Dựa trên đặc tính này, kỹ thuật FISH sử dụng các đầu dò đặc hiệu có gắn huỳnh quang để lai ghép với các đoạn DNA tương đồng trên NST sau khi tách dòng tế bào. Các đoạn dò DNA được đánh dấu huỳnh quang sẽ được lai gắn lên các vị trí tương ứng trên nhiễm sắc thể đích. Sau lai, sản phẩm được quan sát dưới kính hiển vi để tìm tín hiệu huỳnh quang của các đoạn dò được lai. Sự có mặt hay không có tín hiệu huỳnh quang thể hiện có hay không có sự hiện diện của cấu trúc nhiễm sắc thể đặc hiệu tương ứng. Từ đó, xét nghiệm có thể phát hiện bất thường nhiễm sắc thể theo các dòng tế bào một cách chính xác và nhanh chóng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Kit tách tế bào bạch cầu;
- Hóa chất tách dòng tế bào bạch cầu;
- Probe đặc hiệu và sinh phẩm kèm theo;

- 20X SSC;
- NP-40;
- Ficoll;
- PBS 1X;
- DAPI;
- Nước cất, cồn tuyệt đối, xi măng cao su.

2.3. Trang thiết bị

- Bể ổn nhiệt;
- Máy lai FISH;
- Máy ly tâm, máy vortex;
- Kính hiển vi huỳnh quang.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL tủy xương chống đông Sodium Heparin. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, yêu cầu xét nghiệm.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm Di truyền - Sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Chuẩn bị tiêu bản

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm.

- Tách bạch cầu từ mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn đi kèm của bộ sinh phẩm sử dụng.

- Tách tế bào theo dòng, thực hiện theo hướng dẫn đi kèm của bộ sinh phẩm sử dụng.

- Nhược trương, cố định màng tế bào, nhỏ huyền dịch tế bào lên lam kính, sấy khô lam kính theo hướng dẫn đi kèm của nhà sản xuất.

4.1.2. Chuẩn bị probe

Chuẩn bị probe đặc hiệu theo mục đích xét nghiệm, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Lai

- Nhỏ dung dịch probe vào vùng nhỏ tế bào trên tiêu bản sau đó che phủ bằng coverslip.

- Yêu cầu: dung dịch probe dàn đều trên tiêu bản, không có bọt khí.

- Phủ kín coverslip bằng xi măng cao su.

- Đặt vào máy lai, chọn chế độ lai theo hướng dẫn đi kèm của bộ sinh phẩm.

4.1.4. Rửa sau khi lai

- Gỡ bỏ xi măng cao su và coverslip ra khỏi tiêu bản.

- Ngâm và lắc mạnh tiêu bản lần lượt qua các cốc chứa các dung dịch hóa chất (SSC và NP40 pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất) để rửa sạch các probe và hóa chất còn thừa.

4.1.5. Chống mất màu probe

- Nhỏ dung dịch DAPI lên vùng lai để chống mất màu probe và nhuộm nhân tế bào.

- Phủ kín tiêu bản bằng coverslip.

Yêu cầu: dung dịch dàn đều trên tiêu bản và không có bọt khí.

4.2. Phân tích, nhận định kết quả

Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, với kỹ thuật dual colour FISH, chúng ta sẽ thấy các màu:

- Màu xanh da trời: màu nhân tế bào.

- Màu xanh lá cây: màu của probe.

- Màu đỏ: màu của probe.

- Màu xanh da trời đậm (aqua): màu của probe.

Tùy theo loại probe đặc hiệu được sử dụng, tiến hành nhận định và phân tích kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất đi kèm theo từng loại probe tương ứng.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu.	Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã.
Không tín hiệu hoặc tín hiệu yếu.	- Kiểm tra lại kính và các vật kính. - Kiểm tra lại các thiết bị, vật tư, các thành phần dung dịch rửa, điều kiện bảo quản hóa chất sinh phẩm.
Nền quá bẩn.	Tăng thời gian biến tính, kiểm tra adung dịch rửa hoặc rửa lại tiêu bản
Hình thái các NST bị co cụm, biến dạng	- Tăng độ ẩm hoặc tăng nhiệt độ ủ ấm trong quá trình tiến hành thí nghiệm. - Làm già lam trước khi tiến hành FISH 24 giờ. - Chuẩn bị lại thí nghiệm với tiêu bản mới.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu nội kiểm chất lượng: Thực hiện nội kiểm 01 lần/tuần. Khi phân tích kết quả phải có tín hiệu rõ ràng, không bị nhiễu.

- Yêu cầu ngoại kiểm (không bắt buộc): Thực hiện ngoại kiểm/ so sánh liên phòng tối thiểu 1 lần/1 năm, thời gian ngoại kiểm/ so sánh liên phòng ấn định theo chương trình của đơn vị tổ chức ngoại kiểm chất lượng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Emanuela VV and Joanna MB. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques*. 2008; 45:4, 385-409.
2. Ruth BP, Kent MR. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*. 1996; 140:3, 197-216
3. Małgorzata W, Elżbieta K, Katarzyna L, Bartosz B. Hematological methods in FISH - Not only for beginners. *Aquaculture*. 2022; 547. 737498.
4. Fazio F. FISH hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture*. 2019 Feb 1;500:237-42.
5. Grant KR. FISH hematology and associated disorders. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. 2015 Jan 1;18(1):83-103.
6. Hesser EF. Methods for routine FISH hematology. *The Progressive Fish-Culturist*. 1960 Oct 1;22(4):164-71.

9. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ KHẢM TRONG GHÉP TẾ BÀO GỐC KHÁC GIỚI BẰNG KỸ THUẬT FISH

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Kỹ thuật xác định tỷ lệ tế bào mang nhiễm sắc thể giới tính XX/XY trong các trường hợp ghép tế bào gốc khác giới, nhằm mục đích theo dõi đáp ứng cũng như đánh giá điều trị người bệnh sau ghép.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Ghép tế bào gốc tạo máu là phương pháp truyền tế bào gốc tạo máu vào nhằm mục đích thiết lập lại việc sản sinh tế bào máu cho người bệnh có hệ thống miễn dịch hoặc tủy xương bị khiếm khuyết hay tổn thương. Trong những trường hợp ghép tế bào gốc tạo máu từ người cho khác giới tính, để theo dõi điều trị cũng như đánh giá đáp ứng của người bệnh, có thể sử dụng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH). Kỹ thuật FISH được tiến hành dựa trên cơ sở của phản ứng lai DNA. Trong tế bào, phân tử DNA tồn tại dưới dạng phân tử kép gồm 2 chuỗi đơn gắn kết bổ sung với nhau thông qua liên kết hydro. Liên kết hydro là liên kết yếu nên dễ dàng bị đứt gãy dưới tác động của nhiệt độ hay pH cao. Lúc đó, phân tử DNA bị tách thành 2 sợi đơn. Tuy nhiên khi nhiệt độ hay pH thay đổi, liên kết hydro cũng nối lại nhanh chóng. Dựa trên đặc tính này, kỹ thuật FISH sử dụng các đầu dò đặc hiệu có gắn huỳnh quang để lai ghép với các đoạn DNA tương đồng và đặc trưng trên NST giới tính X và Y. Từ đó có thể phát hiện tỷ lệ tế bào mang nhiễm sắc thể giới tính XX/XY trên các dòng tế bào một cách chính xác và nhanh chóng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Hóa chất tách tế bào bạch cầu;
- Hóa chất tách dòng tế bào;
- Probe đặc hiệu và sinh phẩm kèm theo;
- Dung dịch tẩy rửa đặc hiệu;

- DAPI/ thuốc nhuộm nhân tế bào;
- Nước cất, cồn tuyệt đối, xi măng cao su.

2.3. Trang thiết bị

- Bể ổn nhiệt;
- Máy lai FISH;
- Máy ly tâm, máy vortex;
- Kính hiển vi huỳnh quang.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương chống đông Sodium Heparin. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, yêu cầu xét nghiệm.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm đủ tiêu chuẩn thực hiện xét nghiệm Di truyền và Sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Chuẩn bị tiêu bản

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm.
- Tách tế bào theo dòng, thực hiện theo hướng dẫn đi kèm của bộ sinh phẩm sử dụng.

- Nhỏ dung dịch, cố định màng tế bào, nhỏ huyền dịch tế bào lên lam kính, sấy khô lam kính theo hướng dẫn đi kèm của nhà sản xuất.

4.1.2. Chuẩn bị probe

Chuẩn bị probe đặc hiệu gắn X/Y, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Lai

- Nhỏ dung dịch probe vào vùng nhỏ tế bào trên tiêu bản sau đó che phủ bằng coverslip.

- Yêu cầu: dung dịch probe dàn đều trên tiêu bản, không có bọt khí.

- Phủ kín coverslip bằng xi măng cao su.

- Đặt vào máy lai, chọn chế độ lai theo hướng dẫn đi kèm của bộ sinh phẩm.

4.1.4. Rửa sau khi lai

- Gỡ bỏ xi măng cao su và coverslip ra khỏi tiêu bản.

- Ngâm và lắc mạnh tiêu bản lần lượt qua các cốc chứa các dung dịch hóa chất (SSC và NP40 pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất) để rửa sạch các probe và hóa chất còn thừa.

4.1.5. Chống mất màu probe

- Nhỏ dung dịch DAPI lên vùng lai để chống mất màu probe và nhuộm nhân tế bào.

- Phủ kín tiêu bản bằng coverslip.

Yêu cầu: dung dịch dàn đều trên tiêu bản và không có bọt khí.

4.2. Phân tích kết quả

Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, với kỹ thuật dual colour FISH, chúng ta sẽ thấy các màu:

- Màu xanh da trời : màu nhân tế bào.

- Màu xanh lá cây: màu của probe.

- Màu đỏ: màu của probe.

Tiến hành nhận định và phân tích kết quả theo hướng dẫn và quy ước của nhà sản xuất đi kèm theo từng loại probe tương ứng, từ đó xác định tỷ lệ tế bào mang NST giới tính XX/XY theo từng dòng tế bào.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
Không tín hiệu hoặc tín hiệu yếu	- Kiểm tra lại kính và các vật kính - Kiểm tra lại các thiết bị, vật tư, các thành phần dung dịch rửa, điều kiện bảo quản hóa chất sinh phẩm
Nền quá bản	Tăng thời gian biến tính, kiểm tra dung dịch rửa hoặc rửa lại tiêu bản
Hình thái các NST bị co cụm, biến dạng	- Tăng độ ẩm hoặc tăng nhiệt độ ủ ấm trong quá trình tiến hành thí nghiệm - Làm già lam trước khi tiến hành FISH 24 giờ - Chuẩn bị lại thí nghiệm với tiêu bản mới

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu nội kiểm chất lượng: Thực hiện nội kiểm 01 lần/tuần. Khi phân tích kết quả phải có tín hiệu rõ ràng, không bị nhiễu.

- Yêu cầu ngoại kiểm (không bắt buộc): Thực hiện ngoại kiểm/ so sánh liên phòng tối thiểu 1 lần/1 năm, thời gian ngoại kiểm/ so sánh liên phòng ấn định theo chương trình của đơn vị tổ chức ngoại kiểm chất lượng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Emanuela VV and Joanna MB. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. BioTechniques. 2008; 45:4, 385-409.

2. Ruth BP, Kent MR. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*. 1996; 140:3, 197-216
3. Małgorzata W, Elżbieta K, Katarzyna L, Bartosz B. Hematological methods in FISH - Not only for beginners. *Aquaculture*. 2022; 547. 737498.
4. Fazio F. FISH hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture*. 2019 Feb 1;500:237-42.
5. Grant KR. FISH hematology and associated disorders. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. 2015 Jan 1;18(1):83-103.
6. Turkiewicz D, Gorczynska E, Toporski J et al. Monitoring of hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) by dual-color FISH analysis of X and Y chromosomes. *Leukemia research*. 2003 Nov 1;27(11):993-8.
7. Ruiz AD, Chauffaille MD, Alves ST, Oliveira JS. Prevalence of chimerism after non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Sao Paulo Medical Journal*. 2009;127:251-8.

10. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật PCR nhằm phát hiện đột biến điểm hoặc mất/thêm đoạn nhỏ hoặc chèn đoạn, lặp đoạn... trên 1 gen/vùng gen đã được xác định, phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) là một phương pháp tổng hợp DNA dựa trên mạch khuôn là một trình tự đích DNA ban đầu, khuếch đại, nhân số lượng bản sao của khuôn này thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzyme polymerase và một cặp mồi (primer) đặc hiệu cho trình tự đích.

1.2.2. Nguyên lý

Tách DNA tổng số dựa trên nguyên tắc phá vỡ màng tế bào, màng nhân bằng các phương pháp vật lý, hóa học để giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA, và thu nhận lại DNA tinh sạch bằng hóa chất phù hợp.

Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) được thực hiện dựa trên nguyên tắc bổ sung và nhờ hoạt động của enzyme polymerase.

Dựa vào đặc tính cấu trúc của các axit nucleic là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác dụng của điện trường không đổi chúng sẽ di chuyển về cực dương. Tốc độ di chuyển của chúng trên bản thạch agarose phụ thuộc vào kích thước DNA và nồng độ bản thạch.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Đầu côn thường và đầu côn có phin lọc (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 10 μ L...).
- Ống ly tâm 1,5-2 mL; ống PCR các thể tích (0,2-0,5 mL...).

- Khay giữ mẫu các loại (24-48 vị trí...): khay giữ lạnh, khay giữ ống 0,5 mL-2mL-15mL-50mL; Bàn thí nghiệm; tủ đựng hóa chất; hộp lưu mẫu; giấy lau máy và giấy lau tay.

- Ống đựng bệnh phẩm (ống chống đông EDTA, ống đựng mẫu vô trùng...); găng tay; khẩu trang; mũ giấy; băng dính, sát khuẩn tay nhanh.

- Chi phí khác: chi phí phần mềm nội bộ của bệnh viện, chi phí hiệu chuẩn trang thiết bị hoặc chi phí đánh giá ISO (nếu có)...

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Hóa chất dùng chung: nước không chứa Nuclease; ethanol 100%.

- Bộ mẫu chứng gồm mẫu chứng không có đột biến, mẫu chứng âm và dương các loại (nếu có).

- Hóa chất tách DNA: kit tách DNA tổng số, ethanol 100% và 70%.

- Hóa chất PCR: hỗn hợp hóa chất sử dụng trong phản ứng PCR (PCR Master mix...) hoặc enzym (Taq DNA Polymerase...); hỗn hợp 4 loại nucleotid (dNTPs Mix...); môi xuôi và môi ngược (50 nmol/ống...).

- Hóa chất điện di: thạch điện di (agarose); chất nhuộm DNA (nồng độ 5X/6X/10X...); dung dịch đệm điện di; thuốc nhuộm DNA (Ethidium Bromide (10mg/mL...); thang đo DNA (1 kb, 100 bp...); nước cất 2 lần.

- Bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet các thể tích: 0,1-1 μ L; 1-10 μ L; 1-20 μ L; 10-200 μ L; 0,1-1 mL.

- Tủ sạch/Tủ ATSH cấp 1/Tủ ATSH cấp 2, Tủ hút hóa chất.

- Máy luân nhiệt PCR 96 giếng, máy tách DNA tự động; máy quang phổ đo DNA/RNA, hệ thống điện di, hệ thống chụp ảnh gel điện di kèm phần mềm; Máy ly tâm thường; máy ly tâm lạnh.

- Tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C; -40°C; -80°C...).

- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; nồi khử trùng ướt; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh; máy in tem mã vạch.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi; dòng tế bào dịch ối sau nuôi cấy; các bệnh phẩm khác: nước bọt, niêm mạc má, mẫu u, gai rau, máu cuống rốn, mẫu u tươi, DNA tổng số, sản phẩm PCR.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:

- + Máu ngoại vi: 0,5-2 mL, đựng trong ống EDTA vô trùng.
- + Các bệnh phẩm khác: đựng trong ống đựng bệnh phẩm vô trùng.
- + DNA tổng số, sản phẩm PCR: lượng DNA tối thiểu 10 ng/ μ L.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.
- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

6,2 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học: mặc áo vô trùng, đeo khẩu trang, kính bảo hộ, mũ bảo hộ, găng tay khi thực hiện xét nghiệm.

- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất, thiết bị.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung cho các bước thực hiện xét nghiệm:

- + Hóa chất, tiêu hao, dụng cụ và đăng kí sử dụng máy
- + Ghi tên người bệnh/mã số người bệnh lên các ống xét nghiệm.
- + Tính tổng số hóa chất cần pha để thực hiện 1 lần xét nghiệm hoặc xét nghiệm cho 1 mẫu bệnh phẩm.

4.1.1. Tách DNA tổng số

DNA tổng số có thể thực hiện theo 2 cách: tách bằng kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tách thủ công sử dụng các loại hóa chất tương đương như enzyme protease, hóa chất tẩy rửa mạnh (SDS...), dung dịch đệm ly giải, cồn.... Các bước thực hiện như sau:

- Biến tính và phân giải protein: thêm lượng mẫu cần thiết vào ống đã chứa enzyme hoặc hóa chất tương đương nhằm phá màng tế bào và màng nhân; bổ sung dung dịch đệm (nếu cần), trộn đều và ủ ở nhiệt độ phù hợp.

- Loại bỏ protein: protein sau biến tính sẽ được kết tủa và phân lớp hoặc giữ lại trên cột lọc.

- Thu axit nucleic: sử dụng cồn hoặc hóa chất tương đương để rửa DNA hoặc hòa tan DNA và được thu lại bằng cách ly tâm ở tốc độ phù hợp. DNA được hòa tan trong dung dịch phù hợp (nước khử enzyme hoặc dung dịch tương đương) và bảo quản ở nhiệt độ -20°C .

- Kiểm tra chất lượng DNA tổng số bằng điện di hoặc quang phổ kế.

4.1.2. Thực hiện kỹ thuật PCR

- Chuẩn bị phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có), rã đông hóa chất cần dùng.

- Chuẩn bị bộ mẫu cần chạy (ở nhiệt độ phòng) bao gồm: mẫu chứng âm; mẫu chứng dương (nếu có); mẫu trắng; mẫu bệnh phẩm.

- Tính số phản ứng cần chuẩn bị và thể tích hóa chất cần pha cho 2 lần thực hiện xét nghiệm PCR gồm người bệnh và mẫu nội kiểm. Thể tích cho mỗi phản ứng gồm các thành phần sau:

Hóa chất	Thể tích (μL)/ phản ứng
dH ₂ O	
Hỗn hợp hóa chất pha phản ứng PCR	
Mồi xuôi (10 μmol)	
Mồi ngược (10 μmol)	
DNA tổng số	
Tổng thể tích	

- Chia đều hóa chất PCR ra ống PCR 0,2 ul và bổ sung DNA tổng số của người bệnh và các mẫu chứng cần thiết vào ống PCR, chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt PCR và chạy theo chương trình nhiệt của từng xét nghiệm.

4.1.3. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị dung dịch đệm 1X.

- Chuẩn bị bản thạch agarose với nồng độ thích hợp.

+ Lắp lược vào các khay đổ thạch và điều chỉnh khay cân bằng.

+ Cân lượng thạch agarose cần thiết, và bổ sung dung dịch đệm với thể tích tương ứng với nồng độ thạch cần dùng và đun nóng dung dịch thạch bằng lò vi sóng cho đến khi toàn bộ agarose trong dung dịch tan hoàn toàn.

+ Làm nguội dung dịch đến khoảng $50-70^{\circ}\text{C}$ và thêm 5 μL thuốc nhuộm trong 100mL dung dịch agarose, lắc đều (trường hợp không bổ sung thuốc nhuộm DNA, sau điện di bản thạch sẽ ngâm trong dung dịch thuốc nhuộm

DNA) rồi đổ toàn bộ dung dịch thạch agarose vào khuôn đã được cài sẵn lược, để bản thạch nguội ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút.

- Điện di sản phẩm PCR

- + Khi thạch nguội, từ từ nhấc lược ra khỏi khuôn, và đặt bản thạch vào bể điện di.

- + Đổ dung dịch đệm 1X vào bể điện di sao cho dung dịch đệm cao hơn mặt bản thạch khoảng 2-5 mm.

- + Dùng pipet hút 1 thể tích thuốc nhuộm và trộn đều với 5 thể tích sản phẩm PCR. Sau đó, dùng pipet hút toàn bộ mẫu và nhỏ mẫu vào từng giếng trên bản thạch.

- + Đậy nắp bể điện di và cắm điện cực vào nguồn điện di và điện di mẫu trong khoảng 30-50 phút với điện thế 90-200V.

- Chụp ảnh sản phẩm điện di: đặt bản thạch vào máy chụp ảnh gel, đóng nắp, bật đèn UV và chụp theo hướng dẫn của nhà sản xuất; lưu hình ảnh điện di hoặc in ảnh (nếu cần); vệ sinh các dụng cụ điện di bằng cồn 70°C.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả QC

a. Tách DNA

Lượng DNA tổng số được đo trên máy quang phổ đo DNA/RNA tại bước sóng $OD_{260/280nm} \geq 10$ ng và độ tinh sạch DNA trong khoảng 1,8-2,0.

b. Quá trình PCR

- Sản phẩm PCR sợi đôi được kiểm tra bằng cách điện di trên thạch agarose, nồng độ phù hợp, tùy thuộc vào đặc trưng của các gen khuếch đại trong cùng một ống nghiệm.

- Mẫu chứng nội kiểm, mẫu bệnh phẩm xuất hiện băng có kích thước đúng kích thước lý thuyết.

c. Điện di

- Cách thức phân tích kết quả: vị trí của DNA được xác định dựa vào thang DNA chuẩn để ước lượng kích thước của sản phẩm PCR. Băng điện di trên bản thạch phát hiện thấy dưới ánh sáng UV.

- Các băng điện di trên thang DNA chuẩn được sử dụng để đối chiếu với kích thước sản phẩm PCR của người bệnh và nhận định kết quả chỉ khi đạt được độ sáng rõ ràng, băng không bị đứt gãy.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

a. Đọc kết quả

- Kết quả được phân tích độc lập bởi 2 nhân viên khác nhau.
- So sánh kích thước sản phẩm PCR của người bệnh với mẫu chứng và đưa ra kết luận kiểu gen hoặc loại đột biến gen.
- Ghi nhận kết quả phân tích vào hồ sơ tương ứng của người bệnh.

b. Nhận định kết quả

- Danh pháp của các biến thể được viết theo hướng dẫn của HGVS.
- Nhận định kiểu gen tương ứng (đồng hợp tử, dị hợp tử hoặc không phát hiện đột biến...).

4.2.3. Phiên giải và báo cáo kết quả

- Phiên giải kết quả giải trình tự theo hướng dẫn của ACMG.
- Báo cáo kết quả theo quy trình liên quan.

4.2.4. Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Đối chiếu kết quả kiểu gen và kiểu hình theo quy định.
- Tư vấn di truyền hoặc thực hiện thêm xét nghiệm nếu cần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.
- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

- Hồ sơ xét nghiệm được lưu trữ theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và lấy lại mẫu bệnh phẩm
Đổ mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, - Lấy lại mẫu bệnh phẩm

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Thiếu mẫu	- Mẫu bị thất lạc - Đổ mẫu	- Báo cáo lãnh đạo khoa, ghi nhận sự việc, khử nhiễm và liên hệ người bệnh lấy lại mẫu
Mẫu không đạt	- Sai ống đựng mẫu/Sai mẫu bệnh phẩm - Vận chuyển sai quy định - Bảo quản sai quy định	- Lấy lại mẫu bệnh phẩm - Lấy lại mẫu, đào tạo nhân viên vận chuyển mẫu - Lấy lại mẫu, kiểm tra và hiệu chuẩn thiết bị bảo quản mẫu

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Sai quy trình kỹ thuật	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
Hóa chất không đạt	- Bảo quản sai/hết hạn	- Chuẩn bị lại hóa chất - Đào tạo nhân viên sử dụng và bảo quản hóa chất.
Thiết bị dừng đột ngột	- Máy hỏng - Mất điện - Thiếu hóa chất chạy máy	- Sử dụng máy khác cùng chức năng để thực hiện lại xét nghiệm và kiểm tra thiết bị định kỳ, - Đảm bảo nguồn điện ưu tiên và thực hiện lại PCR - Bổ sung hóa chất và khởi động lại máy xét nghiệm
Nhiễm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật và an toàn sinh học	- Xử lý lại mẫu và thực hiện lại xét nghiệm - Giám sát và kiểm tra chéo
DNA không đạt	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
	- Chưa đủ thể tích mẫu - Do tính chất bệnh hoặc thuốc điều trị của người bệnh	- Lấy lại mẫu - Lấy loại mẫu khác
Đổ DNA	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Thực hiện lại quy trình tách DNA - Kiểm tra và đánh giá nhân viên liên tục
Nhiễm mẫu	- Sai sót của nhân viên	- Thực hiện lại quy trình tách xét nghiệm - Kiểm tra và đánh giá nhân viên liên tục
Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Đào tạo liên tục và kiểm tra chéo
PCR không có sản phẩm	- Mất điện - Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo - Nhầm mẫu - Thiếu hóa chất chạy máy	- Thực hiện lại PCR - Đào tạo liên tục và kiểm tra chéo. - Thực hiện lại PCR, giám sát thực hành/kiểm tra chéo - Bổ sung hóa chất chạy máy và thực hiện lại bước chạy máy xét nghiệm
Sản phẩm PCR không đúng kích thước/không đặc hiệu	- Hóa chất hết hạn sử dụng/không được bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất - Nhầm mẫu - Thao tác của nhân viên chưa đạt/chưa đúng	- Thực hiện lại PCR; đào tạo lại nhân viên trong bảo quản và sử dụng hóa chất. - Lấy lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Đào tạo và kiểm tra liên tục

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Mẫu nội kiểm không đạt	- Sử dụng sai mẫu nội kiểm - Sai chu trình nhiệt - Sai mẫu bệnh phẩm	- Chọn lại mẫu nội kiểm và thực hiện lại kỹ thuật - Thực hiện lại PCR - Lấy lại mẫu/tách lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
PCR không có sản phẩm	- Hóa chất hết hạn/bảo quản sai quy định - Nồng độ hóa chất không đúng - Nhân viên không tuân thủ quy trình - Mất điện - Máy hỏng	- Kiểm tra hóa chất trước khi sử dụng, pha lại PCR - Đào tạo và giám sát nhân viên, pha lại PCR - Đào tạo và kiểm tra liên tục và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Thực hiện lại PCR trên máy khác
Sai thang chuẩn	- Nhân viên chưa được đào tạo/ không tập trung	- Chọn lại thang chuẩn và điện di lại sản phẩm PCR
Không có sản phẩm sau điện di	- Sai chu trình nhiệt - Sai điện cực điện di - Dung dịch đệm không đạt	- Thực hiện lại PCR - Điện di lại - Chuẩn bị lại dung dịch đệm và điện di lại
Phân tích kết quả không chính xác	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo	- kiểm tra và phân tích chéo kết quả xét nghiệm hoặc xin ý kiến của bác sĩ lâm sàng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Báo cáo sai kết quả xét nghiệm	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo - Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả	- Thực hiện lại quy trình kỹ thuật nếu cần. - Kiểm tra chéo kết quả - Báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Trả nhầm kết quả xét nghiệm của người bệnh khác	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Báo cáo lãnh đạo và lấy lại mẫu để thực hiện lại xét nghiệm - Đào tạo lại nhân viên
Mất kết quả xét nghiệm	- Nhân viên để sai vị trí lưu kết quả - Nhân viên trả nhầm cho người bệnh khác	- Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác - Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Giá trị báo động/nguy hiểm:

- Lượng DNA tổng số < 1ng/μL, độ tinh sạch (OD_{260/280nm}) ngoài khoảng từ 1,8-2,0.

- PCR của mẫu nội kiểm, mẫu trắng không đạt tiêu chuẩn khi xuất hiện các băng có kích thước khác với kích thước theo lý.

- Tiêu chuẩn đánh giá:

+ Phân tích kết quả được thực hiện khi mẫu nội kiểm đạt yêu cầu (đủ số băng, đúng kích thước).

+ Mẫu trắng không có băng và thang chuẩn phù hợp, tách đều.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Li MM, Cottrell CE, Pullambhatla M, et al. 2023. "Assessments of Somatic Variant Classification Using the Association for Molecular Pathology/American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guidelines: A Report from the Association for Molecular Pathology". J Mol Diagn. 25(2):69-86.
2. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 2001. "Molecular Cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
3. Trần Đức Phấn và cs. 2021. "Di truyền Y học". Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

4. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. 1988. “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science”. 239(4839):487-91.
5. Mullis KB. 1990. “Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction”. *Ann Biol Clin (Paris)*. 48(8):579-82.
6. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
7. Tiêu chuẩn ISO 15189:2022.
8. Hướng dẫn HGVS: <https://hgvs-nomenclature.org/>

11. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX-PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật Multiplex PCR nhằm phát hiện cùng lúc nhiều biến thể đã biết trên cùng 1 gen hoặc nhiều gen đã biết trong cùng 1 phản ứng nhằm phục vụ chẩn đoán, điều trị và tiên lượng bệnh. Ví dụ bệnh di truyền, ung thư...

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật Multiplex PCR là kỹ thuật dựa trên phương pháp PCR nhưng sử dụng cùng lúc nhiều cặp mồi khác nhau trong cùng một phản ứng, nhờ đó có thể khuếch đại nhiều sản phẩm mong muốn có độ lớn khác nhau và nhận biết được nhờ điện di trên agarose có nồng độ cao.

1.2.2. Nguyên lý

Tách DNA tổng số dựa trên nguyên tắc phá vỡ màng tế bào, màng nhân bằng các phương pháp vật lý, hóa học để giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA, thu nhận lại DNA tinh sạch bằng hóa chất phù hợp.

Kỹ thuật Multiplex PCR (Multiplex polymerase chain reaction) sử dụng nhiều cặp mồi khác nhau để khuếch đại các trình tự mục tiêu khác nhau trong cùng một phản ứng. Để thiết kế được phản ứng Multiplex PCR đòi hỏi các cặp mồi sử dụng phải có cùng nhiệt độ bắt cặp và các cặp mồi này cũng không được bắt cặp với nhau hay bắt cặp chéo lẫn nhau.

Dựa vào đặc tính cấu trúc của các axit nucleic là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác dụng của điện trường không đổi chúng sẽ di chuyển về cực dương. Tốc độ di chuyển của chúng trên bản thạch agarose phụ thuộc vào kích thước DNA và nồng độ bản thạch.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Đầu côn thường và đầu côn có phin lọc (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 10 μ L).
- Ống ly tâm 1,5-2 mL; ống PCR các thể tích (0,2-0,5 mL).
- khay giữ mẫu các loại (24-48 vị trí): khay giữ lạnh, khay giữ ống 0,5 mL-2mL-15mL-50mL; bàn thí nghiệm; tủ đựng hóa chất; hộp lưu mẫu; giấy lau máy và lau tay.
- Ống đựng bệnh phẩm (ống chống đông EDTA, ống đựng mẫu vô trùng); găng tay; khẩu trang; mũ giấy; băng dính; sát khuẩn tay nhanh.
- Chi phí khác: chi phí phần mềm nội bộ của bệnh viện, chi phí hiệu chuẩn trang thiết bị hoặc chi phí đánh giá ISO (nếu có)...

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Hóa chất dùng chung: nước không chứa Nuclease; ethanol 100%.
- Bộ mẫu chứng gồm mẫu chứng không có đột biến, mẫu chứng âm và dương các loại (nếu có).
- Hóa chất tách DNA: kit tách DNA tổng số, ethanol 100% và 70%.
- Hóa chất PCR: hỗn hợp hóa chất sử dụng trong phản ứng PCR (PCR Master mix...) hoặc enzym Taq DNA Polymerase; hỗn hợp 4 loại nucleotid (dNTPs Mix...); môi xuôi và môi ngược (50 nmol/ống...).
- Hóa chất điện di: thạch điện di (Agarose); đệm màu tra mẫu điện di DNA (Loading dye) (nồng độ 5X/6X/10X...); dung dịch đệm điện di; thuốc nhuộm huỳnh quang (ethidium bromide, redsafe...) (10mg/mL); thang đo DNA chuẩn, nước cất 2 lần.
- Bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Trang thiết bị

- Pipets với các thể tích: 0,1-2,5 μ L; 1-10 μ L; 10-200 μ L; 100-1000 μ L.
- Tủ sạch/Tủ ATSH cấp 1/Tủ ATSH cấp 2, Tủ hút hóa chất
- Máy luân nhiệt PCR 96 giếng, máy tách DNA tự động; máy quang phổ đo DNA/RNA, hệ thống điện di, hệ thống chụp ảnh gel điện di kèm phần mềm.
- Máy ly tâm: máy ly tâm thường; máy ly tâm lạnh.
- Tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C; -40°C; -80°C...).

- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ôn nhiệt khô; bể ôn nhiệt nước; nồi khử trùng ướ; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh; máy in tem mã vạch.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi; dòng tế bào dịch ối sau nuôi cấy; các bệnh phẩm khác: nước bọt, niêm mạc má, mẫu u, gai rau, máu cuống rốn, mẫu u, DNA tổng số, sản phẩm PCR.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:

- + Máu ngoại vi: 0,5-2 mL, đựng trong ống EDTA vô trùng.
- + Các bệnh phẩm khác: đựng trong ống đựng bệnh phẩm vô trùng.
- + DNA tổng số, sản phẩm PCR đạt chất lượng theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: Kiểm tra thông tin theo quy định.
- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: Kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

6,5 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học: mặc áo vô trùng, đeo khẩu trang, kính bảo hộ, mũ bảo hộ, găng tay khi thực hiện xét nghiệm.
- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất, thiết bị.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung cho các bước thực hiện xét nghiệm:
 - + Hóa chất, tiêu hao, dụng cụ và đăng kí sử dụng máy.
 - + Ghi tên người bệnh/mã số người bệnh lên các ống xét nghiệm.
 - + Phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có): tính tổng số hóa chất cần pha để thực hiện 1 lần xét nghiệm hoặc xét nghiệm cho 1 mẫu bệnh phẩm.
- Các bước được thực hiện bởi 1 nhân viên chính và 1 nhân viên giám sát.

4.1.1. Tách DNA tổng số

DNA tổng số có thể thực hiện theo 2 cách: tách bằng kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tách thủ công sử dụng các loại hóa chất tương đương như enzyme protease, hóa chất tẩy rửa mạnh (SDS...), dung dịch đệm ly giải, cồn.... Các bước thực hiện như sau:

- Biến tính và phân giải protein: thêm lượng mẫu cần thiết vào ống đã chứa enzyme hoặc hóa chất tương đương nhằm phá màng tế bào và màng nhân; bổ sung dung dịch đệm (nếu cần), trộn đều và ủ ở nhiệt độ phù hợp.

- Loại bỏ protein: protein sau biến tính sẽ được kết tủa và phân lớp hoặc giữ lại trên cột lọc.

- Thu axit nucleic: sử dụng cồn hoặc hóa chất tương đương để tủa DNA hoặc hòa tan DNA và được thu lại bằng cách ly tâm ở tốc độ phù hợp. DNA được hòa tan trong dung dịch phù hợp (nước khử enzyme hoặc dung dịch tương đương) và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

- Kiểm tra chất lượng DNA tổng số bằng điện di hoặc quang phổ kế.

4.1.2. Thực hiện kỹ thuật PCR

- Chuẩn bị phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có), rã đông hóa chất cần dùng.

- Chuẩn bị bộ mẫu cần chạy (ở nhiệt độ phòng) bao gồm: mẫu chứng âm; mẫu chứng dương (nếu có); mẫu trắng; mẫu bệnh phẩm.

- Tính số phản ứng cần chuẩn bị và thể tích hóa chất cần pha cho 2 lần thực hiện xét nghiệm PCR gồm người bệnh và mẫu nội kiểm. Thể tích cho mỗi phản ứng gồm các thành phần sau:

Hóa chất	Thể tích (μL)/ phản ứng
dH ₂ O	
Hỗn hợp hóa chất pha phản ứng PCR	
Mồi xuôi (10 μmol)	
Mồi ngược (10 μmol)	
DNA tổng số	
Tổng thể tích	

- Chia đều hóa chất PCR ra ống PCR 0,2 ul và bổ sung DNA tổng số của người bệnh và các mẫu chứng cần thiết vào ống PCR, chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt PCR và chạy theo chương trình nhiệt của từng xét nghiệm.

- Sản phẩm PCR được bảo quản ở -4°C-20°C.

4.1.3. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị dung dịch đệm 1X.
- Chuẩn bị bản thạch agarose với nồng độ thích hợp.
- + Lắp lược vào các khay đổ thạch sao cho lược cân bằng.
- + Cân lượng thạch agarose cần thiết, và bổ sung dung dịch đệm với thể tích tương ứng với nồng độ thạch cần dùng và đun nóng dung dịch thạch cho đến khi toàn bộ agarose trong dung dịch tan hoàn toàn.

+ Làm nguội dung dịch đến khoảng 50-70°C và thêm 5µL thuốc nhuộm trong 100mL dung dịch agarose, lắc đều (trường hợp không bổ sung thuốc nhuộm DNA, sau điện di bản thạch sẽ ngâm trong dung dịch thuốc nhuộm DNA) rồi đổ toàn bộ dung dịch thạch agarose vào khuôn đã được cài sẵn lược, để bản thạch nguội ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút.

- Điện di sản phẩm PCR
 - + Nhấc lược ra khỏi khuôn, đặt bản thạch vào bể điện di.
 - + Đổ dung dịch đệm 1X vào bể điện di sao cho dung dịch đệm cao hơn mặt bản thạch khoảng 2-5 mm.
 - + Dùng pipet hút 1 thể tích thuốc nhuộm và trộn đều với 5 thể tích sản phẩm PCR. Sau đó, dùng pipet hút toàn bộ mẫu và nhỏ mẫu vào từng giếng trên bản thạch.
 - + Đậy nắp bể điện di và cắm điện cực vào nguồn điện di và điện di mẫu trong khoảng 30-50 phút với điện thế 90-200V.
- Chụp ảnh sản phẩm điện di: đặt bản thạch vào máy chụp ảnh gel, đóng nắp, bật đèn UV và chụp theo hướng dẫn của nhà sản xuất; lưu hình ảnh điện di hoặc in ảnh (nếu cần); vệ sinh các dụng cụ điện di bằng cồn 70°C.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả QC

a. Tách DNA

Lượng DNA tổng số được đo trên máy quang phổ đo DNA/RNA tại bước sóng $OD_{260/280nm} \geq 10$ ng và độ tinh sạch DNA trong khoảng 1,8-2,0.

b. Quá trình PCR

- Sản phẩm PCR sợi đôi được kiểm tra bằng cách điện di trên thạch agarose, nồng độ từ 1%-3%, tùy thuộc vào đặc trưng của các gen khuếch đại trong cùng một ống nghiệm.

- Mẫu chứng nội kiểm, mẫu bệnh phẩm xuất hiện băng có kích thước đúng kích thước lý thuyết.

c. Điện di

- Cách thức phân tích kết quả: Băng điện di trên bản thạch phát hiện thấy dưới ánh sáng UV. Vị trí của sản phẩm PCR được xác định dựa vào thang DNA chuẩn để ước lượng kích thước của sản phẩm PCR.

- Các băng điện di trên thang DNA chuẩn được sử dụng để đối chiếu với kích thước sản phẩm PCR của người bệnh và nhận định kết quả chỉ khi đạt được độ sáng rõ ràng, băng không bị đứt gãy.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

a. Đọc kết quả

- So sánh kích thước sản phẩm PCR của người bệnh với mẫu chứng và đưa ra kết luận kiểu gen hoặc loại đột biến gen.

- Ghi nhận kết quả phân tích vào hồ sơ tương ứng của người bệnh.

b. Nhận định kết quả

- Danh pháp của các biến thể được viết theo hướng dẫn của HGVS.

- Nhận định kiểu gen tương ứng (đồng hợp tử, dị hợp tử hoặc không phát hiện đột biến...).

4.2.3. Phiên giải và báo cáo kết quả

- Phiên giải kết quả giải trình tự theo hướng dẫn của ACMG.

- Báo cáo kết quả theo quy trình liên quan.

4.2.4. Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Đối chiếu kết quả kiểu gen và kiểu hình theo quy định.

- Tư vấn di truyền hoặc thực hiện thêm xét nghiệm nếu cần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và lấy lại mẫu bệnh phẩm
Đổ mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, - Lấy lại mẫu bệnh phẩm
Thiếu mẫu	- Mẫu bị thất lạc - Đổ mẫu	- Báo cáo lãnh đạo khoa, ghi nhận sự việc, khử nhiễm và liên hệ người bệnh lấy lại mẫu
Mẫu không đạt	- Sai ống đựng mẫu/Sai mẫu bệnh phẩm - Vận chuyển sai quy định - Bảo quản sai quy định	- Lấy lại mẫu bệnh phẩm - Lấy lại mẫu, đào tạo nhân viên vận chuyển mẫu - Lấy lại mẫu, kiểm tra và hiệu chuẩn thiết bị bảo quản mẫu

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Sai quy trình kỹ thuật	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
Hóa chất không đạt	- Bảo quản sai/hết hạn	- Chuẩn bị lại hóa chất - Đào tạo nhân viên sử dụng và bảo quản hóa chất.
Thiết bị dừng đột ngột	- Máy hỏng - Mất điện	- Sử dụng máy khác cùng chức năng để thực hiện lại xét nghiệm và kiểm tra thiết bị định kỳ, - Đảm bảo nguồn điện ưu tiên và thực hiện lại PCR

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
	- Thiếu hóa chất chạy máy	- Bổ sung hóa chất và khởi động lại máy xét nghiệm
Nhiễm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật và an toàn sinh học	- Xử lý lại mẫu và thực hiện lại xét nghiệm - Giám sát và kiểm tra chéo
Lượng DNA không đạt	- Sai sót của nhân viên - Thiếu thể tích mẫu - Do tính chất bệnh hoặc thuốc điều trị của người bệnh	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo - Lấy lại mẫu - Lấy lại bệnh phẩm khác phù hợp
Đổ DNA	- Sai sót của nhân viên	- Thực hiện lại quy trình tách DNA - Kiểm tra và đào tạo, đánh giá nhân viên liên tục và giám sát thực hiện.
Nhiễm mẫu	- Sai sót của nhân viên - Người bệnh nhiễm trùng máu	- Thực hiện lại quy trình tách xét nghiệm; Kiểm tra và đánh giá nhân viên liên tục và thực hiện lại xét nghiệm. - Lấy lại mẫu và thực hiện lại xét nghiệm.
Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Đào tạo liên tục và kiểm tra chéo
PCR không có sản phẩm	- Mất điện - Sai sót của nhân viên xét nghiệm - Nhầm mẫu - Thiếu hóa chất	- Thực hiện lại PCR - Đào tạo liên tục, giám sát thực hành/kiểm tra chéo. - Lấy lại mẫu - Bổ sung hóa chất chạy máy và thực hiện lại xét nghiệm
Sản phẩm PCR không đúng kích	- Hóa chất hết hạn sử dụng/không được bảo quản đúng quy	- Thực hiện lại PCR; đào tạo lại nhân viên trong bảo quản và sử dụng hóa chất.

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
thước/không đặc hiệu	- định của nhà sản xuất - Nhầm mẫu - Sai sót của nhân viên	- Lấy lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Đào tạo và kiểm tra liên tục
Mẫu nội kiểm không đạt	- Sử dụng sai mẫu nội kiểm - Sai chu trình nhiệt	- Chọn lại mẫu nội kiểm và thực hiện lại kỹ thuật - Thực hiện lại PCR
PCR không có sản phẩm	- Hóa chất hết hạn/bảo quản sai quy định - Nồng độ hóa chất không đúng - Nhân viên không tuân thủ quy trình - Mất điện/Máy hỏng	- Kiểm tra hóa chất trước khi sử dụng, pha lại PCR - Đào tạo và giám sát nhân viên, pha lại PCR - Đào tạo và kiểm tra liên tục và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Thực hiện lại PCR trên máy khác
Sai thang chuẩn	- Sai sót của nhân viên	- Chọn lại thang chuẩn và điện di lại sản phẩm PCR
Không có sản phẩm sau điện di	- Sai chu trình nhiệt - Sai điện cực điện di - Dung dịch đệm không đạt	- Thực hiện lại PCR - Điện di lại - Chuẩn bị lại dung dịch đệm và điện di lại
Sai kết quả xét nghiệm	- Nhầm mẫu bệnh phẩm - Nhầm mẫu chứng - Sai quy trình xét nghiệm - Sai sót của nhân viên	- Lấy lại mẫu. - Thay mẫu chứng phù hợp - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm - Đào tạo, đánh giá và giám sát nhân viên

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Báo cáo sai kết quả xét nghiệm	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo - Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả	- Thực hiện lại quy trình kỹ thuật nếu cần. - Kiểm tra chéo kết quả - Báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.
Trả nhầm kết quả xét nghiệm	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Báo cáo lãnh đạo và lấy lại mẫu để thực hiện lại xét nghiệm - Đào tạo lại nhân viên
Mất kết quả xét nghiệm	- Nhân viên để sai vị trí lưu kết quả - Nhân viên trả nhầm cho người bệnh khác	- Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác - Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Giá trị báo động/nguy hiểm:
 - + Lượng DNA tổng số < 1ng/μL, độ tinh sạch (OD_{260/280nm}) ngoài khoảng từ 1,8-2,0.
 - + PCR của mẫu nội kiểm, mẫu trắng không đạt tiêu chuẩn khi xuất hiện các băng có kích thước khác với kích thước theo lý.
- Tiêu chuẩn đánh giá:
 - + Phân tích kết quả được thực hiện khi mẫu nội kiểm đạt yêu cầu (đủ số băng, đúng kích thước).
 - + Mẫu trắng không có băng và thang chuẩn phù hợp, tách đều.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Li MM, Cottrell CE, Pullambhatla M, et al. 2023. "Assessments of Somatic Variant Classification Using the Association for Molecular Pathology/American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guidelines: A Report from the Association for Molecular Pathology". J Mol Diagn. 25(2):69-86.
2. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 2001. "Molecular Cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

3. Trần Đức Phần và cs. 2021. “Di truyền Y học”. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
4. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel et al. 1988. “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science”. 239(4839):487-91.
5. Mullis KB. 1990. “Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction”. Ann Biol Clin (Paris). 48(8):579-82.
6. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
7. Tiêu chuẩn ISO 15189:2022.
8. Hướng dẫn HGVS: <https://hgvs-nomenclature.org/>

12. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật Real-time PCR nhằm phát hiện các đột biến gen đã được xác định phục vụ cho việc chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Real-time PCR (Realtime Polymerase Chain Reaction): là kỹ thuật PCR mà kết quả khuếch đại đoạn DNA đích được hiển thị ngay sau mỗi chu kỳ của phản ứng PCR; chính vì vậy mà được gọi là real-time: thời gian thực và do đặc điểm này mà với kỹ thuật Real-time PCR, người làm xét nghiệm không cần phải làm tiếp các xét nghiệm để đọc các sản phẩm khuếch đại. Khi thực hiện real-time PCR, các thành phần phản ứng sẽ được trộn với nhau trong tube và đặt trong máy real-time PCR để thực hiện quá trình nhân bản DNA. Thành phần phản ứng qPCR bao gồm: mẫu (khuôn DNA/RNA), môi, chất huỳnh quang, đệm, DNA polymerase, nucleotide tự do (dNTP) và các chất hỗ trợ (nếu cần). Hiện nay có hai cách thức để chuẩn bị cho phản ứng qPCR, đó là phối trộn các thành phần đơn lẻ hoặc sử dụng qPCR mix (các thành phần được phối trộn sẵn thành một loại dung dịch).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;
- Ống đựng máu chứa chất chống đông K2 EDTA;
- Lam kính;
- Lưỡi dao mổ;
- Đầu côn 10 µl có lọc;
- Đầu côn 20 µl có lọc;
- Đầu côn 200 µl có lọc;
- Đầu côn 1mL có lọc;

- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 0,2 mL tiệt trùng;
- Dải ống PCR 0,2 mL;
- Bộ kit xét nghiệm phát hiện đột biến gen;
- Bộ kit tách chiết DNA hoặc RNA;
- Cồn chuyên dụng cho sinh học phân tử;
- Xylene;
- Nước tinh sạch chuyên dùng trong sinh học phân tử;
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi.

2.3. Trang thiết bị

- Kính hiển vi;
- Máy nhuộm HE;
- Bể ổn nhiệt;
- Máy cắt + Bàn tải bệnh phẩm;
- Tủ ẩm;
- Tủ lạnh;
- Tủ hút hoá chất;
- Pipet;
- Bàn sấy tiêu bản;
- Máy Vortex;
- Máy Spin down;
- Tủ An toàn sinh học;
- Máy đo nồng độ DNA/RNA;
- Máy li tâm;
- Tủ thao tác PCR;
- Máy real-time PCR;
- khay đựng mẫu.

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô đã được cố định và vùi nền (FFPE); mẫu mô, mẫu máu; mẫu dịch cơ thể khác.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.

- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu (đối với mẫu máu/dịch cơ thể).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định, ví dụ một số thông tin chung như: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm (nếu có) ...

6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng 6 đến 10 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử..

3. AN TOÀN

Phải đảm bảo an toàn về các quy định của bệnh viện:

- Quy định về hiệu chỉnh vật tư, trang thiết bị;
- Quy định về an toàn điện và phòng chống cháy nổ;
- Quy định về an toàn hóa chất;
- Quy định về an toàn sinh học;
- Quy định về kiểm soát môi trường, rác thải y tế.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tách chiết DNA/RNA

- Quy trình tách chiết để thu được DNA tinh sạch theo Kit tách DNA/RNA.
- Đánh giá nồng độ và chất lượng DNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm sử dụng bộ kit chuyên dụng.
- Lấy các mẫu DNA tách chuẩn bị cho xét nghiệm gen bằng kỹ thuật Real-time PCR.

4.1.2. Thực hiện phản ứng RT-PCR

- Thiết lập hỗn hợp phản ứng RT-PCR.
- Mở phần mềm chạy máy đã cài đặt sẵn.
- Chọn chương trình chạy phù hợp.
- Nạp hóa chất và vật tư tiêu hao cần thiết.

- Chạy máy theo hướng dẫn.

4.2. Nhận định kết quả

- Kiểm tra chất lượng mẫu đối chứng: Kiểm tra kết quả chạy chứng âm và chứng dương kèm theo bộ kit.
- Đọc và nhận định kết quả mẫu nội chứng:
- + Đọc và ghi nhận kết quả tự động trên máy.
- + Kết luận và bàn luận một số trường hợp đặc biệt.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo các quy trình liên quan. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:
- + Thực hiện lấy lại mẫu.
- + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.
- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng:
- + Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình.
- + Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.

5.2 Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.
- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Kiểm tra lại chất lượng DNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3 Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả:
- + Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
- + Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
3. Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
4. Rebrikov, D. V., & Trofimov, D. Y. (2006). Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Applied biochemistry and microbiology*, 42, 455-463.

Phụ lục 1

Quy trình khuếch đại toàn bộ hệ gen bằng Single Cell Kit (Qiagen)

1. Trộn hỗn hợp: Proteinase K solution (2 μ L) + Single-cell lysis and fragmentation buffer (32 μ L).
2. Lấy 1 μ L hỗn hợp được trộn bước 1 + 9,0 μ L dung dịch đã chứa tế bào phôi.
3. Ủ 50°C trong 1 giờ; 99°C trong 4 phút, sau đó ngay lập tức chuyển ống chứa sản phẩm trên lên khay đá.
4. Thêm 3 μ L hỗn hợp dung dịch (tỷ lệ 2 Single-cell library preparation buffer: 1 Library stabilization buffer).
5. Ủ hỗn hợp trên 95°C trong 2 phút, ngay lập tức chuyển sang khay đá và ly tâm mẫu.
6. Thêm 1 μ L Library preparation enzyme mixture; Sau đó cho chạy Pre PCR (16°C trong 20 phút; at 24°C trong 20 phút; at 37°C trong 20 phút; at 75°C for 5 phút; duy trì ở 4°C. Hỗn hợp sản phẩm này có thể để được 3 ngày, lưu ở - 20 °C.
7. Thêm 61 μ L (7,5 μ L Amplification premix + nước 48,5 μ L + 5 μ L WGA DNA polymerase). Sau đó chạy PCR (95°C trong 3 phút; 25 chu kỳ (94 °C trong 30 giây; 65 °C trong 5 phút); duy trì 4 °C).
8. Tinh sạch sản phẩm WGA bằng hạt từ.
9. Mẫu DNA thu được sau khuếch đại được tiến hành đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch. Mẫu DNA được pha loãng về nồng độ từ 10-20 ng/ μ L để thực hiện phản ứng tiếp theo.

13. XÉT NGHIỆM GEN TRƯỚC SINH VỚI TẾ BÀO ỒI; GAI NHAU BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN SANGER

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm gen trước sinh bằng phương pháp Sanger nhằm xác định đột biến đơn gen có nguồn gốc di truyền từ bố/mẹ trên mẫu DNA của thai nhi.

Giải trình gen bằng phương pháp Sanger được ứng dụng để xét nghiệm cho các bệnh di truyền đã xác định đột biến gen đích, phục vụ cho chẩn đoán trước sinh bệnh di truyền và tư vấn di truyền.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật giải trình tự bằng phương pháp Sanger là kỹ thuật giải trình tự cho 1 đoạn gen/1 trình tự gen đã biết bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp Sanger.

1.2.2. Nguyên lý

- Trong quá trình mang thai, các tế bào thai nhi ở da, niêm mạc miệng, hệ thống tiêu hóa, tiết niệu bong ra giải phóng vào buồng ối. Do vậy nuôi cấy dịch ối sẽ thu hoạch được dòng tế bào của thai nhi. Dịch ối được nuôi cấy trong flask thành dòng tế bào, sau đó cấy chuyển sang đĩa petri với lamên làm giá đỡ. Tách DNA tổng số từ dòng tế bào ối dựa trên nguyên tắc phá vỡ màng tế bào, màng nhân bằng các phương pháp vật lý, hóa học để giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA, thu nhận lại DNA tinh sạch bằng hóa chất phù hợp.

- Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) được thực hiện dựa trên nguyên tắc bổ sung và nhờ hoạt động của enzyme polymerase, tổng hợp in vitro trình tự gen đích.

- Dựa vào đặc tính cấu trúc của các axit nucleic là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác dụng của điện trường không đổi chúng sẽ di chuyển về cực dương. Tốc độ di chuyển của chúng trên bản thạch agarose phụ thuộc vào kích thước DNA và nồng độ bản thạch.

- Giải trình tự gen Sanger dựa trên nguyên lý “kết thúc chuỗi” để tổng hợp các trình tự nucleotide sợi đơn trong một phản ứng có ddNTPs. Việc tổng hợp trình tự diễn ra bằng cách làm dừng ngẫu nhiên khi mỗi loại ddNTP được

gắn vào, kết quả là tạo ra các đoạn DNA sợi đơn hơn kém nhau một nucleotide. Các trình tự DNA được đọc bằng hệ thống điện di mao quản tự động.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Đầu côn thường và đầu côn có phin lọc (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 10 μ L...); ống ly tâm các loại (1,5-2 mL; 15 mL; 50 mL); ống PCR các thể tích (0,2-0,5 mL...); chai thủy tinh các thể tích; chai nuôi cấy có ống thông khí; chai thủy tinh (250 mL, 500 mL...); cốc thủy tinh; pipet các thể tích (10 mL, 3 mL; pipet pasteur...)

- Bộ mao quản các loại: 50 cm, 70 cm (4 vị trí hoặc 8 vị trí...). Khay chứa mẫu 96 giếng; tấm cao su đập đĩa chạy mẫu và khay chứa đệm.

- Khay giữ mẫu các loại (24-48 vị trí...): khay giữ lạnh, khay giữ ống 0,5 mL-2mL-15mL-50mL; bàn thí nghiệm; tủ đựng hóa chất; hộp lưu mẫu; giấy lau máy và lau tay.

- Ống đựng mẫu (ống chống đông EDTA vô trùng); trang bị bảo hộ cá nhân (găng tay; khẩu trang; mũ giấy); băng dính giấy; giấy in kết quả, sát khuẩn tay nhanh.

- Chi phí khác: chi phí phần mềm nội bộ của bệnh viện, chi phí hiệu chuẩn trang thiết bị hoặc chi phí đánh giá ISO (nếu có)...

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Nước không chứa Nuclease; ethanol 100%, Ethanol 70%, nước cất 2 lần.

- Bộ mẫu chứng gồm mẫu chứng không có đột biến, mẫu chứng âm và dương các loại (nếu có).

- Hỗn hợp hóa chất pha PCR (PCR Master mix, Taq, dNTPs, Mg^{2+} ...); 4 loại nucleotid tự do (dNTPs mix...); trình tự mỗi xuôi và mỗi ngược (5'-3').

- Hóa chất điện di: thạch điện di (Agarose); đệm màu tra mẫu điện di DNA (Loading dye) (nồng độ 5X/6X/10X...); dung dịch đệm điện di; thuốc

nhuộm huỳnh quang DNA (ethidium bromide, red safe...); thang đo DNA chuẩn (DNA ladder) các loại (1 kb, 100 bp...).

- Hóa chất tách DNA/kit tách DNA tổng số; hóa chất tinh sạch sản phẩm PCR sợi đôi và sợi đơn, hóa chất giải trình tự gen.

- Hóa chất điện di mao quản: khay đệm cho cực âm và cực dương máy điện di mao quản; đệm điện di mao quản; hóa chất căn chỉnh cho máy điện di mao quản.

- Hóa chất nuôi cấy, hóa chất thu hoạch tế bào ối, hóa chất làm nổi tế bào bám dính; hóa chất rửa tế bào. - Hóa chất được sử dụng và bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet và đầu lọc tương ứng với các thể tích: 0,1-1 μ L; 1-10 μ L; 1-20 μ L; 10-200 μ L; 0,1-1 mL.

- Tủ sạch/tủ ATSH cấp 1/tủ ATSH cấp 2, tủ hút

- Hệ thống điện di mao quản, máy luân nhiệt PCR 96 giếng, máy tách DNA tự động; máy quang phổ đo DNA/RNA, hệ thống điện di, hệ thống chụp ảnh điện di kèm phần mềm.

- Máy ly tâm: máy ly tâm thường; máy ly tâm lạnh; máy ly tâm mini spin; máy ly tâm đĩa; tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C; -40°C; -80°C ...).

- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; nồi khử trùng ướt; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh; máy in tem mã vạch; phần mềm quản lý bệnh viện.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: dịch ối/gai nhau sau nuôi cấy; DNA tổng số tách từ dòng tế bào ối/gai nhau, sản phẩm PCR được khuếch đại từ dòng tế bào ối/gai nhau.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:

- + Dịch ối: 5-15 mL, đựng trong ống vô trùng.

- + Tế bào gốc trung mô, gai nhau đựng trong ống vô trùng.

- + DNA tổng số, sản phẩm PCR hoặc sản phẩm PCR đã tinh sạch.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.

- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

33,8 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học.
- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất, thiết bị.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung cho các bước thực hiện xét nghiệm:
 - + khay giữ lạnh; khay đựng ống 1,5 mL, khay đựng ống 50 mL và ống PCR và ống 1,5 mL, bút viết, hộp lưu mẫu.
 - + Tiêu hao, dụng cụ và đăng kí sử dụng máy.
 - + Ghi tên người bệnh/mã số người bệnh lên các ống xét nghiệm.
 - + Phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có); tính tổng số hóa chất cần pha để thực hiện 1 lần xét nghiệm hoặc xét nghiệm cho 1 mẫu bệnh phẩm.
- Các bước được thực hiện bởi 1 nhân viên chính và 1 nhân viên giám sát.

4.1.1. Nuôi cấy tế bào dịch ối

- Mỗi mẫu bệnh phẩm được nuôi cấy vào 2 chai nuôi cấy và 1 mẫu chứng.
- Điền đầy đủ thông tin của người bệnh và kiểm tra chất lượng mẫu qua đánh giá thể tích, màu sắc dịch ối (vẩn đục, có máu) vào trong phiếu theo dõi thực hành xét nghiệm.
- Cho thể tích môi trường nuôi cấy phù hợp (ví dụ 3,5 mL...) vào chai nuôi cấy. Ghi thông tin người bệnh vào chai.
- Ly tâm ống đựng dịch ối ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 5 phút, chuyển ống đựng mẫu đã ly tâm vào tủ ATSH, kiểm tra cận tế bào, bỏ phần dịch nổi.
- Dùng pipet hút toàn bộ cận tế bào của mẫu ối đã ly tâm và chuyển vào chai nuôi cấy đã bổ sung môi trường.
- Cân đều môi trường trên bề mặt chai nuôi cấy và đặt chai nuôi cấy vào trong tủ ấm, 5% CO₂, 37°C.

- Hàng ngày, kiểm tra hình dạng, số lượng tế bào ồi bằng kính hiển vi soi ngược.

- Sau 5-10 ngày, kỹ thuật viên kiểm tra tình trạng bám dính và phát triển của tế bào ồi nuôi cấy dưới kính hiển vi soi ngược. Nếu đủ lượng tế bào cần thiết, nhân viên thực hiện thay môi trường bằng cách chuyển toàn bộ môi trường nuôi cấy trong chai nuôi cấy vào ống đựng mẫu ồi ban đầu (lưu ở ngăn mát tủ lạnh cho đến khi kết thúc xét nghiệm. Dịch nổi này có thể được sử dụng để nuôi cấy tiếp trong trường hợp cần thiết).

- Bổ sung thể tích (ví dụ 2,5-3 mL...) dung dịch rửa tế bào vào chai nuôi cấy (tráng nhẹ chai nuôi cấy), loại bỏ dịch và bổ sung tiếp 3,5 mL môi trường nuôi cấy mới vào chai nuôi cấy, chuyển chai nuôi cấy vào tủ ấm, 5% CO₂, 37°C.

- Kiểm tra sự phát triển của tế bào ồi để quyết định thời điểm thu hoạch (sau 5-7 ngày).

4.1.2. Thu hoạch tế bào ồi từ chai nuôi cấy

- Chuẩn bị trước thu hoạch: Rã đông hóa chất làm nổi tế bào (trypsin...) trong ngăn mát tủ lạnh, rã đông môi trường nuôi cấy nếu cần thiết (cần 10 mL/chai nuôi cấy) để cấy lưu mẫu và chuẩn bị các dụng cụ cần thiết: 1 cốc thủy tinh, chai Duran.

- Chuyển dịch nổi trong chai nuôi cấy vào ống ly tâm vô trùng 15mL (có ghi tên, mã số người bệnh và số thứ tự chai nuôi cấy).

- Bổ sung dung dịch làm nổi tế bào vào trong chai nuôi cấy để tráng hết bề mặt. Hút dịch nổi và chuyển vào ống ly tâm 15mL đựng dung dịch ở trên.

- Bổ sung tiếp dung dịch làm nổi tế bào vào trong chai nuôi cấy, ủ ở 37°C trong 3 phút.

- Kiểm tra lượng tế bào đã tách khỏi bề mặt chai nuôi cấy dưới kính hiển vi soi ngược. Nếu vẫn còn nhiều tế bào bám dính, gõ nhẹ vào thành chai nuôi cấy hoặc dùng dụng cụ nạo tế bào (cell scraper) để tách nốt các tế bào còn trên bề mặt chai nuôi cấy.

- Hút hết dịch nổi trong chai nuôi cấy và chuyển sang ống ly tâm 15mL đựng dịch tế bào ở trên.

- Thêm thể tích môi trường nuôi cấy phù hợp (1,5-5 mL) vào để tráng đều bề mặt chai nuôi cấy, và chuyển hết dịch nổi vào ống ly tâm 15mL dịch tế bào ở trên.

- Ly tâm ống dịch tế bào ở 1800 vòng/phút trong 5 phút. Kiểm tra cận tế bào, loại bỏ phần dịch nổi. Gõ nhẹ vào ống ly tâm để cận tế bào không bám dính dưới đáy ống.

- Thêm vào ống dung dịch rửa tế bào vô trùng, ly tâm ống dịch tế bào ở 1800 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi và lặp lại bước rửa 2 lần.

- Loại bỏ dịch rửa tế bào, giữ lại khoảng 400 μ L dung dịch chứa cận tế bào và hút 200 μ L phần dịch nổi đến để tách DNA tổng số.

4.1.3. Tách DNA tổng số từ dịch ối, gai nhau sau nuôi cấy bằng kit thương mại

DNA tổng số có thể thực hiện theo 2 cách: tách bằng kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tách thủ công sử dụng các loại hóa chất tương đương như enzyme protease, hóa chất tẩy rửa mạnh (SDS...), dung dịch đệm ly giải, cồn.... Các bước thực hiện như sau:

Biến tính và phân giải protein: thêm lượng mẫu cần thiết vào ống đã chứa enzyme hoặc hóa chất tương đương nhằm phá màng tế bào và màng nhân; bổ sung dung dịch đệm (nếu cần), trộn đều và ủ ở nhiệt độ phù hợp.

Loại bỏ protein: protein sau biến tính sẽ được kết tủa và phân lớp hoặc giữ lại trên cột lọc.

Thu axit nucleic: sử dụng cồn hoặc hóa chất tương đương để tủa DNA hoặc hòa tan DNA và được thu lại bằng cách ly tâm ở tốc độ phù hợp. DNA được hòa tan trong dung dịch phù hợp (nước khử enzyme hoặc dung dịch tương đương) và bảo quản ở nhiệt độ -20°C .

Kiểm tra chất lượng DNA tổng số bằng điện di hoặc quang phổ kế.

4.1.4. Thực hiện kỹ thuật PCR

- Rã đông các hóa chất.

- Chuẩn bị bộ mẫu cần chạy (ở nhiệt độ phòng) bao gồm: mẫu chứng âm; mẫu chứng dương (nếu có); mẫu trắng; mẫu bệnh phẩm.

- Tính số hóa ống cần chuẩn bị và thể tích hóa chất cần pha cho người bệnh và mẫu nội kiểm. Thể tích cho mỗi phản ứng gồm các thành phần sau:

Hóa chất	Thể tích (μL)/ phản ứng
dH ₂ O	
Hỗn hợp hóa chất pha phản ứng PCR	
Mồi xuôi (10 μmol)	
Mồi ngược (10 μmol)	
DNA tổng số	
Tổng thể tích	

- Chia đều hóa chất PCR ra ống PCR 0,2 μL và bổ sung DNA tổng số của dòng tế bào ối và các mẫu chứng cần thiết vào ống PCR, chuyển các ống PCR vào máy gia nhiệt và chạy theo chương trình nhiệt của từng loại xét nghiệm.

4.1.5. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị dung dịch đệm 1 X.
- Sử dụng bản thạch agarose thương mại hoặc chuẩn bị bản thạch agarose với nồng độ thích hợp.
 - + Lấp lược vào các khay đổ thạch và điều chỉnh khay cân bằng.
 - + Cân lượng thạch agarose cần thiết, và bổ sung dung dịch đệm với thể tích tương ứng với nồng độ thạch cần dùng và đun nóng dung dịch thạch cho đến khi toàn bộ agarose trong dung dịch tan hoàn toàn.
 - + Làm nguội dung dịch đến khoảng 50-70°C và thêm thuốc nhuộm DNA vào dung dịch agarose, lắc đều (trường hợp không bổ sung thuốc nhuộm DNA, sau điện di bản thạch sẽ ngâm trong dung dịch thuốc nhuộm DNA) rồi đổ toàn bộ dung dịch thạch agarose vào khuôn đã được cài sẵn lược, để bản thạch nguội ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút.
- Điện di sản phẩm PCR
 - + Đổ dung dịch đệm 1X vào bể điện di sao cho dung dịch đệm cao hơn mặt bản thạch khoảng 2-5 mm.
 - + Dùng pipet hút 1 thể tích thuốc nhuộm và trộn đều với 5 thể tích sản phẩm PCR. Sau đó, dùng pipet hút toàn bộ mẫu và nhỏ mẫu vào từng giếng trên bản thạch. Đặt nắp bể điện di và cắm điện cực vào nguồn điện di và điện di mẫu trong khoảng thời gian và điện thế thích hợp.

- Chụp ảnh sản phẩm điện di: đưa bản thạch vào máy chụp ảnh gel, đóng nắp, bật đèn UV và chụp theo hướng dẫn của nhà sản xuất; lưu hình ảnh điện di hoặc in ảnh (nếu cần); vệ sinh các dụng cụ điện di bằng cồn 70°C.

4.1.6. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Quá trình tinh sạch sản phẩm PCR sợi đôi bằng kit thương mại và tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Sản phẩm PCR tinh sạch được bảo quản ở 4°C trong trường hợp dùng ngay hoặc lưu trữ ở -20°C.

- Kiểm tra sản phẩm PCR sợi đôi đã tinh sạch bằng phương pháp điện di.

4.1.7. Pha hóa chất PCR sợi đơn

- Pha hóa chất PCR sợi đơn gồm các thành phần sau:

Hóa chất	Thể tích (μL)/ phản ứng
dH ₂ O	
BigDye v3.1	
5X buffer	
Mồi đơn (10 μmol)	
Sản phẩm PCR tinh sạch	
Tổng thể tích	

- Chuyển các ống PCR vào máy gia nhiệt và chạy theo chương trình phù hợp, sản phẩm PCR được bảo quản ở 4-8°C cho đến khi thực hiện các xét nghiệm tiếp theo.

4.1.8. Tinh sạch sản phẩm PCR sợi đơn

- Tinh sạch sản phẩm PCR sợi đơn bằng hóa chất thương mại và thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.9. Điện di mao quản

- Khởi động máy điện di mao quản, thiết lập chương trình trên máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Hút thể tích dung dịch sản phẩm PCR sợi đơn đã tinh sạch (10-20 μL) và nhỏ vào các giếng trên khay chứa mẫu.

- Đặt khay chứa mẫu vào đúng vị trí trên máy điện di mao quản.

- Tiến hành chạy máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.2.0. Thu thập dữ liệu trình tự gen và phân tích

- Thu thập các trình tự gen sau khi điện di mao quản.

- Lựa chọn trình tự gen tham chiếu phù hợp trên ngân hàng gen quốc tế để so sánh với trình tự gen cần phân tích bằng phần mềm chuyên dụng độc lập bởi 2 nhân viên khác nhau.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả QC

a. Nuôi cấy và thu hoạch tế bào ối

- Kiểm tra chai nuôi cấy tế bào dịch ối sau 72h: các chai nuôi cấy đạt chất lượng khi môi trường nuôi cấy trong, xuất hiện dần các tế bào bám dính lên bề mặt chai nuôi cấy.

- Nếu mẫu bị nhiễm trùng (dung dịch chuyển màu đục) sẽ hủy mẫu và ngừng nuôi cấy.

b. Tách DNA

DNA đạt chất lượng khi lượng DNA đo tại bước sóng $OD_{260/280nm} \geq 10$ ng và độ sạch trong khoảng 1,8-2,0.

c. PCR

- Sử dụng thạch agarose và thang DNA chuẩn phù hợp với kích thước của đoạn gen quan tâm.

- Kết quả điện di sản phẩm PCR phải rõ ràng, đúng kích thước lý thuyết, mẫu Blank control (BC) không có băng, mẫu chứng nội kiểm, mẫu bệnh phẩm xuất hiện băng có kích thước đúng kích thước lý thuyết.

d. Tinh sạch

Sản phẩm PCR tinh sạch có băng đặc hiệu, không xuất hiện các vệt sáng (smear).

e. Giải trình tự gen

- Tín hiệu rõ ràng, nằm trong giới hạn được quy định của nhà sản xuất.
- Trình tự gen thu được phải bắt đầu từ trình tự môi, ngoại trừ trường hợp mất đoạn xảy ra tại vị trí bắt cặp của trình tự môi.
- Trình tự môi xuôi và môi ngược có thể ghép được với nhau ngoại trừ trường hợp đặc biệt như bị đột biến mất/thêm đoạn...

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

a. Đọc kết quả

- Phân tích trình gen bằng phần mềm chuyên dụng kèm theo máy hay phần mềm thương mại (Chromas, mutation surveyor...). So sánh trình tự gen

đích với trình tự gen tham chiếu và xác định sự thay đổi trên trình tự gen đích nếu có và xác định biến thể trên gen:

- + Xác định loại đột biến gen.
- + Xác định vị trí xảy ra đột biến trên cDNA và sự thay đổi của các axit amin liên quan đến đột biến.
- Ghi nhận kết quả phân tích vào hồ sơ tương ứng của người bệnh.

b. Nhận định kết quả

- Xác định tên biến thể và kiểu gen của người bệnh theo hướng dẫn HGVS.
- Nhận định kiểu gen tương ứng (đồng hợp tử, dị hợp tử hoặc không phát hiện đột biến...).

4.2.3. Phiên giải và báo cáo kết quả

- Phiên giải kết quả giải trình tự theo hướng dẫn của ACMG.
- Báo cáo kết quả theo các quy trình liên quan.

4.2.4. Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Đối chiếu kết quả kiểu gen, kiểu hình theo quy định.
- Tư vấn di truyền hoặc thực hiện thêm xét nghiệm nếu cần và sàng lọc cho các thành viên trong gia đình người bệnh có đột biến gen.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các Quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.
- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.
- Tư vấn di truyền và hướng dẫn chẩn đoán trước sinh.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

- Hồ sơ xét nghiệm được lưu theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
- Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Đổ mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, - Lấy lại mẫu bệnh phẩm
- Thiếu mẫu	- Mẫu bị thất lạc - Đổ mẫu	- Báo cáo lãnh đạo khoa, ghi nhận sự việc, khử nhiễm và liên hệ lấy lại mẫu
- Mẫu không đạt	- Sai ống đựng mẫu/Sai mẫu bệnh phẩm - Vận chuyển sai quy định - Bảo quản sai quy định	- Lấy lại mẫu bệnh phẩm - Lấy lại mẫu, đào tạo nhân viên vận chuyển mẫu - Lấy lại mẫu, kiểm tra và hiệu chuẩn tủ bảo quản mẫu

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
- Sai quy trình kỹ thuật	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
- Hóa chất không đạt	- Bảo quản sai/hết hạn	- Chuẩn bị lại hóa chất - Đào tạo nhân viên sử dụng và bảo quản hóa chất.
- Thiết bị dùng đột ngột	- Máy hỏng - Mất điện - Thiếu hóa chất chạy máy	- Sử dụng máy khác cùng chức năng để thực hiện lại xét nghiệm và kiểm tra thiết bị định kỳ, - Đảm bảo nguồn điện ưu tiên và thực hiện lại PCR - Bổ sung hóa chất và khởi động lại máy xét nghiệm
- Nhiễm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật và an toàn sinh học	- Xử lý lại mẫu và thực hiện lại xét nghiệm - Giám sát và kiểm tra chéo

- Lượng DNA không đạt	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo - Không sử dụng đúng dung dịch hòa tan DNA khi căn chỉnh máy đo DNA. - Do tính chất bệnh hoặc thuốc điều trị.	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo - Căn chỉnh lại máy đo bằng dung dịch hòa tan DNA và đo lại. - Lấy lại mẫu
- Đổ DNA	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Thực hiện lại quy trình tách DNA - Kiểm tra và đánh giá nhân viên liên tục
- Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Đào tạo liên tục và kiểm tra chéo
- Sản phẩm PCR không đúng kích thước/không đặc hiệu	- Hóa chất hết hạn sử dụng/không được bảo quản đúng quy định. - Nhầm mẫu - Thao tác của nhân viên chưa đạt/chưa đúng	- Thực hiện lại PCR; đào tạo lại nhân viên trong bảo quản và sử dụng hóa chất. - Lấy lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Đào tạo và kiểm tra liên tục
- Mẫu nội kiểm không đạt	- Sử dụng sai mẫu nội kiểm - Sai chu trình nhiệt - Sai mẫu bệnh phẩm	- Chọn lại mẫu nội kiểm và thực hiện lại kỹ thuật - Thực hiện lại PCR - Lấy lại /tách lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
- PCR không có sản phẩm	- Hóa chất hết hạn/bảo quản sai quy định - Nồng độ hóa chất không đúng - Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Kiểm tra hóa chất trước khi sử dụng, pha lại PCR - Đào tạo và giám sát nhân viên, pha lại PCR

	- Mất điện - Máy hỏng	- Đào tạo và kiểm tra liên tục và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Thực hiện lại PCR - Sửa máy và thực hiện lại PCR
- Sai thang chuẩn	- Nhân viên chưa được đào tạo/không tập trung	- Chọn lại thang chuẩn và điện di lại sản phẩm PCR
- Không có sản phẩm sau điện di PCR	- Sai chu trình nhiệt - Sai điện cực điện di - Dung dịch đệm không đạt	- Thực hiện lại PCR - Điện di lại - Chuẩn bị lại dung dịch đệm và điện di lại
- Không có sản phẩm tinh sạch sau điện di	- Nhân viên không tuân thủ quy trình - Sai điện cực điện di - Dung dịch đệm không đạt	- PCR và tinh sạch lại. - Điện di lại - Chuẩn bị lại dung dịch đệm và điện di lại
- Trình tự gen không đạt	- Lượng DNA khuôn quá ít/nhiều - Hóa chất điện di mao quản quá hạn - Kỹ thuật của nhân viên chưa chuẩn	- Tiến hành lại phản ứng PCR - Thay hóa chất điện di mao quản hoặc thay mao quản - Đào tạo lại nhân viên và kiểm tra, giám sát
- Không có trình tự gen	- Sai phương pháp chạy - Sai môi - Kỹ thuật của nhân viên chưa chuẩn	- Chọn lại phương pháp chạy - Pha lại hóa chất PCR và/hoặc giải trình tự gen - Đào tạo lại nhân viên và kiểm tra, giám sát
- Phân tích và nhận định sai kết quả	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Phân tích lại, đào tạo lại nhân viên, kiểm tra chéo khi thực hành.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
- Sai thông tin người bệnh	- Nhân viên không tuân thủ quy trình - Do nhập liệu sai trên hệ thống của bệnh viện	- Đối chiếu thông tin người bệnh và hồ sơ xét nghiệm và sửa lại thông tin người bệnh - Liên hệ CNTT hỗ trợ sửa thông tin người bệnh và in lại kết quả.
- Báo cáo sai kết quả xét nghiệm	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Thực hiện lại quy trình kỹ thuật nếu cần. - Phân tích và nhận định lại - Kiểm tra chéo kết quả
- Trả nhầm kết quả xét nghiệm của người bệnh khác	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Báo cáo lãnh đạo và lấy lại mẫu để thực hiện lại xét nghiệm - Đào tạo lại nhân viên
- Mất kết quả xét nghiệm	- Nhân viên để kết quả xét nghiệm sai vị trí - Nhân viên trả nhầm cho người bệnh khác	- Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác - Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác
- Kết quả 2 dòng tế bào của 1 mẫu không trùng	- Nhân viên không tuân thủ quy trình - Mẫu có tình trạng khảm	- Báo cáo lãnh đạo khoa, kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và thực hiện lại quy trình xét nghiệm. - Nuôi cấy thêm dòng tế bào, thực hiện lại xét nghiệm và làm thêm xét nghiệm bằng kỹ thuật khác.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Giá trị báo động/nguy hiểm:
 - + Nếu số lượng cụm tế bào NST <10 tế bào/vi trường.
 - + Lượng DNA tổng số < 10 ng/μL, độ tinh sạch (OD_{260/280nm}) ngoài khoảng từ 1,8-2,0.
 - + Hóa chất hết hạn sử dụng
 - + Kết quả điện di mao quản không có tín hiệu
- Tiêu chuẩn đánh giá: mẫu đạt khi đảm bảo các yêu cầu sau
 - + Mẫu nội kiểm trong, không có tế bào mọc.
 - + Chất lượng tế bào dịch ối sau nuôi cấy đảm bảo đủ mật độ tế bào bám dính trên bề mặt chai nuôi cấy.
 - + Mẫu trắng (BC) không có băng khi PCR.
 - + Các mẫu chứng nội kiểm có kích thước đúng kích thước lý thuyết.
 - + Sản phẩm PCR được điện di cùng thang chuẩn phù hợp, rõ ràng.
 - + Thang đo DNA phù hợp với kích thước sản phẩm PCR.
 - + Tín hiệu các nucleotide trong giới hạn cho phép, chân không bị nhiễu.
 - + Mẫu nội kiểm PCR có băng đúng kích thước lý thuyết.
 - + Chất lượng tín hiệu chạy điện di mao quản đạt yêu cầu.
 - + Phân tích và kiểm tra chéo trước khi phê duyệt kết quả.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Li MM, Cottrell CE, Pullambhatla M et al. 2023. "Assessments of Somatic Variant Classification Using the Association for Molecular Pathology/American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guidelines: A Report from the Association for Molecular Pathology". J Mol Diagn. 25(2):69-86.
2. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 2001. "Molecular Cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
3. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. 1988. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science". 239(4839):487-91.

4. Mullis KB. 1990. "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction". *Ann Biol Clin (Paris)*. 48(8):579-82.
5. Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. *Br Med Bull*. 1983. 39(4):348-54.
6. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
7. Tiêu chuẩn ISO 15189:2022.
8. Hướng dẫn HGVS: <https://hgvs-nomenclature.org/>

14. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT MLPA

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật MLPA nhằm phát hiện đột biến đã biết trên gen/vùng gen cụ thể.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật khuếch đại đa đầu dò dựa trên phản ứng ghép nối (MLPA) là một kỹ thuật bán định lượng được sử dụng để xác định số lượng bản sao của tối đa 60 trình tự DNA đặc hiệu trong cùng một phản ứng.

1.2.2. Nguyên lý

- Tách DNA tổng số dựa trên nguyên tắc phá vỡ màng tế bào, màng nhân bằng các phương pháp vật lý, hóa học để giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA, thu nhận lại DNA tinh sạch bằng hóa chất phù hợp.

- Kỹ thuật MLPA dựa trên phản ứng PCR khuếch đại nhiều đoạn gen khác nhau chỉ với 1 cặp mồi duy nhất. Phản ứng MLPA tạo ra một tập hợp các sản phẩm PCR có chiều dài từ 64-500 nt được phân tách bằng điện di mao quản.

- Kỹ thuật MLPA là một kỹ thuật phát hiện sự thay đổi số lượng bản sao bằng cách so sánh chiều cao của các đỉnh tín hiệu các đoạn trong phản ứng MLPA. So sánh chiều cao của đỉnh tín hiệu mẫu DNA đích với đỉnh tín hiệu tương ứng của mẫu DNA đối chứng, cung cấp thông tin về trạng thái số lượng bản sao gen của trình tự đích. Việc xóa một hoặc nhiều trình tự đích có thể nhìn thấy khi chiều cao đỉnh giảm tương ứng, trong khi sự gia tăng chiều cao đỉnh phản ánh sự gia tăng số lượng bản sao.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Đầu côn thường và đầu côn có phin lọc (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 10 μ L).

- Ống ly tâm 1,5-2 mL; ống PCR các thể tích (0,2-0,5 mL).

- Bộ mao quản các loại: 50 cm, 70 cm (4 vị trí hoặc 8 vị trí), Khay chứa mẫu 96 giếng; Tấm cao su đẩy đĩa chạy mẫu và đẩy khay đệm cho máy điện di mao quản.

- Khay giữ mẫu các loại (24-48 vị trí): khay giữ lạnh, khay giữ ống 0,5 mL-2mL-15mL-50mL; Bàn thí nghiệm; tủ đựng hóa chất; hộp lưu mẫu; giấy lau máy và giấy lau tay.

- Ống đựng bệnh phẩm (ống chống đông EDTA, ống đựng mẫu vô trùng); trang bị bảo hộ: găng tay; khẩu trang; mũ giấy; băng dính; sát khuẩn tay nhanh.

- Chi phí khác: chi phí phần mềm nội bộ của bệnh viện, chi phí hiệu chuẩn trang thiết bị hoặc chi phí đánh giá ISO (nếu có)...

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Hóa chất dùng chung: nước không chứa Nuclease.

- Bộ mẫu chứng gồm mẫu chứng không có đột biến, mẫu chứng âm và dương các loại (nếu có).

- Hóa chất tách DNA: kit tách DNA tổng số, ethanol 100% và 70%.

- Hóa chất PCR: hỗn hợp hóa chất sử dụng trong phản ứng PCR (PCR Master mix...) hoặc enzym Taq DNA Polymerase; hỗn hợp 4 loại nucleotid (dNTPs Mix...); môi xuôi và môi ngược (5'-3') (50 nmol/ống).

- Hóa chất MLPA (Salsa MLPA Probemix...); dung dịch đệm điện di mao quản (Hidi formamide...); thang chuẩn điện di mao quản (Genscan 500 Liz...); nước không chứa Nuclease.

- Hóa chất điện di mao quản: khay đệm cho cực âm và cực dương máy điện di mao quản (Anode Buffer Container (ABC), Cathode Buffer Container (CBC); POP-7 Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers...); hóa chất căn chỉnh cho máy điện di mao quản (DS-33 Matrix Standard (Dye set G5)...).

- Bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet các thể tích: 0,1-1 μ L; 1-10 μ L; 1-20 μ L; 10-200 μ L; 0,1-1 mL.

- Tủ sạch, tủ ATSH, tủ hút hóa chất.

- Hệ thống điện di mao quản, máy luân nhiệt PCR 96 giếng, máy tách DNA tự động; máy quang phổ đo DNA/RNA, hệ thống điện di, hệ thống chụp ảnh gel điện di kèm phần mềm.

- Máy ly tâm thường; máy ly tâm lạnh; máy ly tâm đĩa; Tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C; -40°C; -80°C).

- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; nồi khử trùng ướt; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh; máy in tem mã vạch.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi; dòng tế bào dịch ối sau nuôi cấy; các bệnh phẩm khác: nước bọt, niêm mạc má, mẫu u, gai rau, máu cuống rốn, tế bào MSC sau nuôi cấy, DNA tổng số, sản phẩm PCR.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:

- + Máu ngoại vi: 0,5-2 mL, đựng trong ống EDTA vô trùng.
- + Các bệnh phẩm khác: đựng trong ống đựng bệnh phẩm vô trùng.
- + DNA tổng số, sản phẩm PCR đạt chất lượng theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.
- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

6,2 giờ.

2.7. Đại điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học: mặc áo vô trùng, đeo khẩu trang, kính bảo hộ, mũ bảo hộ, găng tay khi thực hiện xét nghiệm.

- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất, thiết bị.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung cho các bước thực hiện xét nghiệm:

- + Hóa chất, tiêu hao và đăng ký sử dụng máy.
- + Ghi tên người bệnh/mã số người bệnh lên các ống xét nghiệm.

- + Chuẩn bị phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có): tính tổng số hóa chất cần pha để thực hiện 1 lần xét nghiệm hoặc xét nghiệm cho 1 mẫu bệnh phẩm.

- Các bước được thực hiện bởi 1 nhân viên chính và 1 nhân viên giám sát.

4.1.1. Tách DNA tổng số

DNA tổng số có thể thực hiện theo 2 cách: tách bằng kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tách thủ công sử dụng các loại hóa chất tương đương như enzyme protease, hóa chất tẩy rửa mạnh (SDS...), dung dịch đệm ly giải, cồn.... Các bước thực hiện như sau:

- Biến tính và phân giải protein: thêm lượng mẫu cần thiết vào ống đã chứa enzyme hoặc hóa chất tương đương nhằm phá màng tế bào và màng nhân; bổ sung dung dịch đệm (nếu cần), trộn đều và ủ ở nhiệt độ phù hợp.

- Loại bỏ protein: protein sau biến tính sẽ được kết tủa và phân lớp hoặc giữ lại trên cột lọc.

- Thu axit nucleic: sử dụng cồn hoặc hóa chất tương đương để tủa DNA hoặc hòa tan DNA và được thu lại bằng cách ly tâm ở tốc độ phù hợp. DNA được hòa tan trong dung dịch phù hợp (nước khử enzyme hoặc dung dịch tương đương) và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Kiểm tra chất lượng DNA tổng số bằng điện di hoặc quang phổ kế.

4.1.2. Thực hiện kỹ thuật MLPA

- Rã đông các hóa chất: Để hóa chất tan từ từ trên khay giữ lạnh đến khi hóa chất tan hoàn toàn rồi bảo quản trong khay giữ lạnh.

- Chuẩn bị bộ mẫu cần chạy (ở nhiệt độ phòng) bao gồm: mẫu chứng âm; mẫu chứng dương (nếu có); mẫu trắng; mẫu bệnh phẩm.

- Thực hiện phản ứng MLPA theo các bước sau:

Bước 1: Biến tính DNA

- Lấy lượng DNA cần thiết (5 µl DNA hoặc lượng tương đương 50-200 ng DNA) cho vào ống PCR 0,2 mL đã ghi tên.

- Đặt ống vào máy PCR, biến tính DNA tổng số theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Bước 2: Lai các đầu dò

- Pha hỗn hợp hóa chất lai đầu dò theo các thành phần sau:

Hóa chất	Số lượng (µL)/ mẫu
----------	--------------------

Hỗn hợp đầu dò	
Dung dịch đệm	
Tổng thể tích	

- Chia thể tích cần thiết (ví dụ 3 μL ...) hóa chất đã pha vào các ống PCR chứa DNA đã biến tính và trộn đều, ủ mẫu theo chu trình nhiệt theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Bước 3: Phản ứng ghép nối

- Pha hỗn hợp hóa chất ghép nối theo các thành phần theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Nước không chứa Nuclease	
Dung dịch đệm 1	
Dung dịch đệm 2	
Dung dịch đệm 3	
Tổng thể tích	

- Giữ mẫu ở nhiệt độ 54°C, thêm thể tích (ví dụ 16 μL ...) dung dịch đệm trên vào mỗi mẫu, trộn đều và ủ ở nhiệt độ theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Bước 4: Phản ứng PCR

- Pha hỗn hợp dung dịch PCR theo các thành phần theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Nước không chứa Nuclease	
Dung dịch chứa trình tự mồi	
Enzyme Polymerase	
Tổng thể tích	

- Giữ mẫu ở nhiệt độ 20°C, chia thể tích cần thiết (ví dụ 6 μL ...) hỗn hợp PCR vào mỗi mẫu, sau đó trộn đều bằng Pippet và thực hiện phản ứng PCR.
- Thực hiện chu trình nhiệt PCR theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4.1.3. Điện di sản phẩm MLPA bằng máy điện di mao quản

- Khởi động máy điện di mao quản, thiết lập chương trình trên máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Pha hỗn hợp dung dịch điện di mao quản theo các thành phần sau:

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Dung dịch đệm di mao quản	
Than chuẩn điện di mao quản	
Sản phẩm PCR	
Tổng thể tích	

- Hút thể tích cần thiết (ví dụ 10-20 μL...) hỗn hợp vừa pha theo khuyến cáo của nhà sản xuất và nhỏ vào các giếng trên khay chứa mẫu.

- Đậy nắp và đặt khay chứa mẫu vào đúng vị trí trên máy điện di mao quản, tiến hành chạy máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.4. Thu thập dữ liệu và phân tích

- Kết quả phản ứng MLPA được thu thập và lưu trữ theo quy định.

- Phân tích kết quả MLPA bằng phần mềm chuyên dụng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả QC

a. Tách DNA

Lượng DNA tổng số được đo trên máy quang phổ đo DNA/RNA tại bước sóng $OD_{260/280nm} \geq 10$ ng và độ tinh sạch DNA trong khoảng 1,8-2,0.

b. Điện di sản phẩm MLPA

- Kiểm tra tín hiệu rõ ràng, không nhiễu, kích thước dải tín hiệu tối ưu, tối thiểu và tối đa cho các thiết bị điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất và thiết bị.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

a. Đọc kết quả

- Kết quả được phân tích độc lập bởi 2 nhân viên khác nhau, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Tỷ lệ tín hiệu (Final Ratio - FR) được phân tích bằng việc so sánh các tín hiệu các đoạn của mẫu bệnh phẩm với đoạn tương ứng của mẫu đối chứng.

- Độ lệch chuẩn của từng đoạn so với các đoạn tham chiếu phải $\leq 0,10$.

- Phân tích tỷ lệ tín hiệu tại vị trí các đầu dò và tương quan giữa kiểu gen
- số bản sao gen.

b. Nhận định kết quả

- Xác định tên biến thể theo hướng dẫn của HGVS.
- Nhận định kiểu gen tương ứng (đồng hợp tử, dị hợp tử hoặc không phát hiện đột biến...).

4.2.3. Phiên giải và báo cáo kết quả

- Phiên giải kết quả theo hướng dẫn của ACMG.
- Báo cáo kết quả theo các quy trình hướng dẫn liên quan.

4.2.4. Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Đối chiếu kết quả kiểu gen-kiểu hình theo quy định.
- Tư vấn di truyền hoặc thực hiện thêm xét nghiệm nếu cần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.
- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Nguyên nhân	Nguy cơ	Xử trí
- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	Nhầm mẫu	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và lấy lại mẫu bệnh phẩm
- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	Đổ mẫu	- Đào tạo nhân viên liên tục, - Lấy lại mẫu bệnh phẩm
- Mẫu bị thất lạc - Đổ mẫu	Thiếu mẫu	- Báo cáo lãnh đạo khoa, ghi nhận sự việc, khử nhiễm và liên hệ người bệnh lấy lại mẫu
- Sai ống đựng mẫu/Sai mẫu bệnh phẩm	Mẫu không đạt	- Lấy lại mẫu bệnh phẩm

Nguyên nhân	Xử trí
- Vận chuyển sai quy định - Bảo quản sai quy định	- Lấy lại mẫu, đào tạo nhân viên vận chuyển mẫu - Lấy lại mẫu, kiểm tra và hiệu chuẩn thiết bị bảo quản mẫu

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Nguyên nhân	Xử trí
Sai quy trình kỹ thuật	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
Hóa chất không đạt	- Chuẩn bị lại hóa chất - Đào tạo nhân viên sử dụng và bảo quản hóa chất.
Thiết bị dừng đột ngột	- Máy hỏng - Mất điện - Thiếu hóa chất chạy máy - Sử dụng máy khác cùng chức năng để thực hiện lại xét nghiệm và kiểm tra thiết bị định kỳ, - Đảm bảo nguồn điện ưu tiên và thực hiện lại PCR - Bổ sung hóa chất và khởi động lại máy xét nghiệm
Nhiễm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật và an toàn sinh học - Xử lý lại mẫu và thực hiện lại xét nghiệm - Giám sát và kiểm tra chéo
Lượng DNA không đạt	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo - Lấy lại mẫu - Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo - Ít mẫu - Do tính chất bệnh hoặc thuốc điều trị của người bệnh
Độ DNA	- Thực hiện lại quy trình tách DNA - Nhân viên không tuân thủ quy

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
	trình/chưa được đào tạo	- Kiểm tra và đánh giá nhân viên liên tục
Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Đào tạo liên tục và kiểm tra chéo
Sản phẩm MLPA không đúng kích thước/không đặc hiệu	- Hóa chất hết hạn sử dụng/không được bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất - Nhầm mẫu/ hóa chất - Thao tác của nhân viên chưa đạt/chưa đúng	- Thực hiện lại MLPA; đào tạo lại nhân viên trong bảo quản và sử dụng hóa chất. - Lấy lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Đào tạo và kiểm tra liên tục
Mẫu nội kiểm không đạt	- Sử dụng sai mẫu nội kiểm - Sai chu trình nhiệt - Sai mẫu bệnh phẩm	- Chọn lại mẫu nội kiểm và thực hiện lại kỹ thuật - Thực hiện lại phản ứng - Lấy lại mẫu/tách lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
Tín hiệu các đầu dò trên mức tín hiệu tối ưu	- Quá nhiều sản phẩm PCR	- Giảm thời gian điện di/ hiệu điện thế - Sử dụng ít sản phẩm PCR hơn (Tối đa 10% tổng thể tích mẫu điện di) - Pha loãng sản phẩm PCR
Các đỉnh của đầu dò MLPA dốc xuống	- Bay hơi trong gia đoạn lai qua đêm - Bay hơi trong bước phản ứng nối - Tạp chất từ mẫu DNA	- Kiểm tra nắp gia nhiệt - Sử dụng đầu ngăn bay hơi, đảm bảo ống PCR đóng chặt. - Giảm thời gian thao tác mở nắp (sử dụng pipet đa kênh) - Pha loãng hoặc tinh sạch DNA
Không có sản phẩm MLPA	- Hóa chất hết hạn/bảo quản sai quy định	- Kiểm tra hóa chất trước khi sử dụng, pha lại PCR

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
	- Nồng độ hóa chất không đúng - Nhân viên không tuân thủ quy trình - Mất điện - Máy hỏng	- Thực hiện lại phản ứng MLPA trên máy khác
Phân tích kết quả không chính xác	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo	- kiểm tra và phân tích chéo kết quả xét nghiệm hoặc xin ý kiến của bác sĩ lâm sàng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Báo cáo sai kết quả xét nghiệm	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo - Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả	- Thực hiện lại quy trình kỹ thuật nếu cần. - Kiểm tra chéo kết quả - Báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.
Nhầm/mất kết quả xét nghiệm	- Kết quả để sai vị trí/thất lạc/nhầm tên. - Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Báo cáo lãnh đạo và lấy lại mẫu để thực hiện lại xét nghiệm - Đào tạo lại nhân viên

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Giá trị báo động/nguy hiểm: Lượng DNA tổng số $< 1\text{ ng}/\mu\text{L}$, độ tinh sạch ($\text{OD}_{260/280\text{nm}}$) ngoài khoảng từ 1,8-2,0.
- Mẫu nội kiểm đạt chất lượng.
- Chất lượng tín hiệu chạy điện di mao quản đạt yêu cầu.
- Phân tích và kiểm tra chéo trước khi phê duyệt kết quả.
- Kiểm soát chất lượng kỹ thuật MLPA: Phụ lục

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Eijk-Van Os PG, Schouten JP. (2011) Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) for the detection of copy number variation in genomic sequences. Methods Mol Biol.

2. Trần Đức Phần và cs. 2021. “Di truyền Y học”. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
3. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
4. Tiêu chuẩn ISO 15189:2022.
5. Hướng dẫn HGSVS: <https://hgvs-nomenclature.org/>

15. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ GEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SANGER

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger được sử dụng để phân tích một hoặc nhiều đoạn gen đích nhằm phát hiện và xác định đột biến/ biến thể gen liên quan đến chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật giải trình tự bằng phương pháp Sanger là kỹ thuật giải trình tự cho 1 đoạn gen đã biết bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp Sanger.

1.2.2. Nguyên lý

- Tách DNA tổng số dựa trên nguyên tắc phá vỡ màng tế bào, màng nhân bằng các phương pháp vật lý, hóa học để giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA.

- Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) được thực hiện dựa trên nguyên tắc bổ sung và nhờ hoạt động của enzyme polymerase.

- Dựa vào đặc tính cấu trúc của các axit nucleic là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác dụng của điện trường không đổi chúng sẽ di chuyển về cực dương. Tốc độ di chuyển của chúng trên bản thạch agarose phụ thuộc vào kích thước DNA và nồng độ bản thạch.

- Giải trình tự gen Sanger dựa trên nguyên lý “kết thúc chuỗi” để tổng hợp các trình tự nucleotide sợi đơn trong một phản ứng có ddNTPs. Việc tổng hợp trình tự diễn ra bằng cách làm dừng ngẫu nhiên khi mỗi loại ddNTP được gắn vào, kết quả là tạo ra các đoạn DNA sợi đơn hơn kém nhau một nucleotide. Các trình tự đoạn DNA được đọc bằng hệ thống điện di mao quản tự động.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Đầu côn thường và đầu côn có phin lọc (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 10 μ L).
- Ống ly tâm các loại (1,5-2 mL; 15 mL; 50 mL); ống PCR các thể tích (0,2-0,5 mL); chai thủy tinh các thể tích; khay chứa mẫu để điện di mao quản; tấm cao su đẩy đĩa chạy mẫu và khay đệm cho máy điện di mao quản.
- Bộ mao quản các loại: 50 cm, 70 cm (4 vị trí hoặc 8 vị trí).
- Khay giữ mẫu các loại (24-48 vị trí): khay giữ lạnh, khay giữ ống 0,5 mL-2mL-15mL-50mL.
- Bàn thí nghiệm; tủ đựng hóa chất; hộp lưu mẫu; giấy lau máy và lau tay.
- Ống đựng mẫu (ống chống đông EDTA vô trùng...), trang bị bảo hộ cá nhân (găng tay; khẩu trang; mũ giấy); băng dính giấy; giấy in kết quả; sát khuẩn tay nhanh.
- Chi phí khác: chi phí phần mềm nội bộ của bệnh viện, chi phí hiệu chuẩn trang thiết bị hoặc chi phí đánh giá ISO (nếu có)...

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Nước không chứa Nuclease; ethanol 100%, Ethanol 70%, nước cất 2 lần.
- Bộ mẫu chứng gồm mẫu chứng không có đột biến, mẫu chứng âm và dương các loại (nếu có).
- Hỗn hợp hóa chất pha PCR (PCR Master mix, Taq, dNTPs, Mg^{2+} ...); 4 loại nucleotid tự do (dNTPs mix...); trình tự môi xuôi và môi ngược.
- Hóa chất điện di: thạch điện di (Agarose); đệm màu tra mẫu điện di DNA (Loading dye) (nồng độ 5X/6X/10X...); dung dịch đệm điện di; thuốc nhuộm huỳnh quang (ethidium bromide, red safe...); thang đo DNA chuẩn (DNA ladder) các loại (1 kb, 100 bp...).
- Hóa chất tách DNA/kit tách DNA tổng số; hóa chất tinh sạch sản phẩm PCR sợi đơn và sợi đơn, hóa chất giải trình tự gen.
- Hóa chất điện di mao quản: khay đệm cho cực âm và cực dương máy điện di mao quản; đệm điện di mao quản; hóa chất căn chỉnh cho máy điện di mao quản.
- Hóa chất được sử dụng và bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Trang thiết bị

- Pipets với các thể tích: 0,1-2.5 μ L; 1-10 μ L; 10-200 μ L; 100-1000 μ L.

- Tủ sạch/tủ ATSH cấp 1/tủ ATSH cấp 2, tủ hút
- Hệ thống điện di mao quản, máy luân nhiệt PCR 96 giếng, máy tách DNA tự động; máy quang phổ đo DNA/RNA, hệ thống điện di, hệ thống chụp ảnh điện di kèm phần mềm.
- Máy ly tâm: máy ly tâm thường; máy ly tâm lạnh; máy ly tâm mini spin; máy ly tâm đĩa.
- Tủ lạnh và tủ âm các loại (-20 °C; -40 °C; -80 °C ...).
- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; nồi khử trùng ướt; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh; máy in tem mã vạch; phần mềm quản lý bệnh viện.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi; dòng tế bào dịch ối sau nuôi cấy; các bệnh phẩm khác: nước bọt, niêm mạc má, mẫu u, gai rau, DNA tổng số, sản phẩm PCR.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Các bệnh phẩm khác: máu ngoại vi, gai nhau, mô, tế bào niêm mạc má, máu cuống rốn, mẫu u... đựng trong ống đựng mẫu vô trùng.
 - + DNA tổng số, sản phẩm PCR đạt tiêu chuẩn quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.
- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

13,8 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học.
- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Chuẩn bị chung cho các bước thực hiện xét nghiệm:

- + khay giữ lạnh; khay đựng ống 1,5 mL và ống PCR, bút viết.
- + Tiêu hao, dụng cụ và đăng ký sử dụng máy.

- + Ghi tên người bệnh/mã số người bệnh lên các ống xét nghiệm.
- + Phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có): tính tổng số hóa chất cần pha để thực hiện 1 lần xét nghiệm hoặc xét nghiệm cho 1 mẫu bệnh phẩm.

- Các bước được thực hiện bởi 1 nhân viên chính và 1 nhân viên giám sát.

4.1.1. Tách DNA tổng số

DNA tổng số có thể thực hiện theo 2 cách: tách bằng kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tách thủ công sử dụng các loại hóa chất tương đương như enzyme protease, hóa chất tẩy rửa mạnh (SDS...), dung dịch đệm ly giải, cồn.... Các bước thực hiện như sau:

- Biến tính và phân giải protein: thêm lượng mẫu cần thiết vào ống đã chứa enzyme hoặc hóa chất tương đương nhằm phá màng tế bào và màng nhân; bổ sung dung dịch đệm (nếu cần), trộn đều và ủ ở nhiệt độ phù hợp.

- Loại bỏ protein: protein sau biến tính sẽ được kết tủa và phân lớp hoặc giữ lại trên cột lọc.

- Thu axit nucleic: sử dụng cồn hoặc hóa chất tương đương để tủa DNA hoặc hòa tan DNA và được thu lại bằng cách ly tâm ở tốc độ phù hợp. DNA được hòa tan trong dung dịch phù hợp (nước khử enzyme hoặc dung dịch tương đương) và bảo quản ở nhiệt độ -20 °C.

- Kiểm tra chất lượng DNA tổng số bằng điện di hoặc quang phổ kế.

4.1.2. Thực hiện kỹ thuật PCR

- Chuẩn bị phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có) và rã đông hóa chất cần dùng và chuẩn bị bộ mẫu (ở nhiệt độ phòng) bao gồm: mẫu chứng âm; mẫu chứng dương (nếu có); mẫu trắng; mẫu bệnh phẩm.

- Tính số phản ứng cần chuẩn bị và thể tích hóa chất cần pha cho người bệnh và mẫu nội kiểm. Thể tích cho mỗi phản ứng gồm các thành phần sau:

Hóa chất	Thể tích (μL)/ phản ứng
Nước không chứa DNAase/RNAase	
Hỗn hợp hóa chất pha phản ứng PCR	
Môi xuôi (10 μmol)	
Môi ngược (10 μmol)	
DNA tổng số	
Tổng thể tích	

- Chia đều hóa chất PCR ra ống PCR 0,2 μL và bổ sung DNA tổng số của người bệnh và các mẫu chứng cần thiết vào ống PCR, chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt PCR và chạy theo chương trình nhiệt của từng xét nghiệm.

4.1.3. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị dung dịch đệm 1X.
- Sử dụng bản thạch agarose thương mại hoặc chuẩn bị bản thạch agarose với nồng độ thích hợp.

+ Lắp lược vào các khay đổ thạch và điều chỉnh khay cân bằng.
+ Cân lượng thạch agarose cần thiết, bổ sung dung dịch đệm với thể tích tương ứng với nồng độ thạch cần dùng và đun nóng dung dịch thạch cho đến khi toàn bộ agarose trong dung dịch tan hoàn toàn.

+ Làm nguội dung dịch đến khoảng 50-70 °C và thêm thuốc nhuộm DNA vào dung dịch agarose, lắc đều (trường hợp không bổ sung thuốc nhuộm DNA, sau điện di bản thạch sẽ ngâm trong dung dịch thuốc nhuộm DNA) rồi đổ toàn bộ dung dịch thạch agarose vào khuôn đã được cài sẵn lược, để bản thạch nguội ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút.

- Điện di sản phẩm PCR

+ Đổ dung dịch đệm 1X vào bể điện di sao cho dung dịch đệm cao hơn mặt bản thạch khoảng 2-5 mm.

+ Dùng pipet hút 1 thể tích thuốc nhuộm và trộn đều với 5 thể tích sản phẩm PCR. Sau đó, dùng pipet hút toàn bộ mẫu và nhỏ mẫu vào từng giếng trên bản thạch. Đặt nắp bể điện di và cắm điện cực vào nguồn điện di và điện di mẫu trong khoảng thời gian và điện thế thích hợp.

- Chụp ảnh sản phẩm điện di: đưa bản thạch vào máy chụp ảnh gel, đóng nắp, bật đèn UV và chụp theo hướng dẫn của nhà sản xuất; lưu hình ảnh điện di hoặc in ảnh (nếu cần); vệ sinh các dụng cụ điện di bằng cồn 70°C.

4.1.4. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Quá trình tinh sạch sản phẩm PCR sợi đôi bằng kit thương mại và tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Sản phẩm PCR tinh sạch được bảo quản ở 4 °C trong trường hợp dùng ngay hoặc lưu trữ ở -20 °C.
- Kiểm tra sản phẩm PCR sợi đôi đã tinh sạch bằng phương pháp điện di.

4.1.5. Pha hóa chất PCR sợi đơn

- Pha hóa chất PCR sợi đơn gồm các thành phần sau:

Hóa chất	Số lượng (μL)/ phản ứng
dH ₂ O	
Hóa chất giải trình tự gen	
Dung dịch đệm	
Mỗi đơn (10 μmol)	
Sản phẩm PCR tinh sạch	
Tổng thể tích	

- Chuyển các ống PCR vào máy gia nhiệt và chạy theo chương trình phù hợp, sản phẩm PCR được bảo quản ở điều kiện phù hợp cho đến khi thực hiện tiếp các xét nghiệm khác.

4.1.6. Tinh sạch sản phẩm PCR sợi đơn

- Tinh sạch sản phẩm PCR sợi đơn bằng kit thương mại và thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.7. Điện di mao quản

- Khởi động máy điện di mao quản, thiết lập chương trình trên máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Hút thể tích phù hợp (10-20 μL) sản phẩm PCR sợi đơn đã tinh sạch và nhỏ vào các giếng trên khay chứa mẫu.
- Đặt khay chứa mẫu vào đúng vị trí trên máy điện di mao quản.
- Tiến hành chạy máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.8. Thu thập dữ liệu trình tự gen và phân tích

- Thu thập các trình tự gen sau khi điện di mao quản.
- Lựa chọn trình tự gen tham chiếu phù hợp trên ngân hàng gen quốc tế để so sánh với trình tự gen cần phân tích bằng phần mềm chuyên dụng.
- Trình tự gen được phân tích độc lập bởi 2 nhân viên khác nhau.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả QC

a. Tách DNA

- Lượng DNA tổng số tối thiểu ≥ 10 ng và độ tinh sạch tại bước sóng $OD_{260/280nm}$ từ 1,8-2,0.

b. Sản phẩm PCR

- Sử dụng thạch agarose và thang DNA chuẩn phù hợp với kích thước của đoạn gen quan tâm.

- Kết quả điện di sản phẩm PCR phải rõ ràng, đúng kích thước lý thuyết, mẫu Blank control (BC) không có băng, mẫu chứng nội kiểm, mẫu bệnh phẩm xuất hiện băng có kích thước đúng kích thước lý thuyết.

d. Tinh sạch

- Sản phẩm PCR tinh sạch có băng đặc hiệu, không xuất hiện các vệt sáng (smear).

e. Giải trình tự gen

- Tín hiệu rõ ràng, kích thước gen thu được tối thiểu phải bắt đầu từ trình tự môi nếu trình tự không bị mất đoạn tại vị trí bắt cặp của môi.
- Trình tự môi xuôi và môi ngược có thể ghép được với nhau ngoại trừ trường hợp đặc biệt như bị đột biến mất/thêm đoạn...

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

a. Đọc kết quả

- Kết quả được phân tích độc lập bởi 2 nhân viên khác nhau.

- Phân tích trình gen bằng phần mềm chuyên dụng kèm theo máy hay phần mềm thương mại (Chromas, mutation surveyor...). So sánh trình tự gen đích với trình tự gen tham chiếu và xác định sự thay đổi trên trình tự gen đích nếu có và xác định biến thể trên gen:

- + Xác định loại đột biến gen.
- + Xác định vị trí xảy ra đột biến trên cDNA và sự thay đổi của các axit amin liên quan đến đột biến.
- Ghi nhận kết quả phân tích vào hồ sơ tương ứng của người bệnh.

b. Nhận định kết quả

- Xác định tên biến thể và kiểu gen của người bệnh theo hướng dẫn HGVS.

- Nhận định kiểu gen tương ứng (đồng hợp tử, dị hợp tử hoặc không phát hiện đột biến...).

4.2.3. Phiên giải và báo cáo kết quả

- Phiên giải kết quả giải trình tự theo hướng dẫn của ACMG.
- Báo cáo kết quả theo quy trình liên quan.

4.2.4. Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Đối chiếu kết quả kiểu gen, kiểu hình theo quy định.
- Tư vấn di truyền hoặc thực hiện thêm xét nghiệm nếu cần và sàng lọc cho các thành viên trong gia đình người bệnh có đột biến gen.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.
- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.
- Tư vấn di truyền và hướng dẫn chẩn đoán trước sinh.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
- Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và lấy lại mẫu bệnh phẩm
- Đổ mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, - Lấy lại mẫu bệnh phẩm
- Thiếu mẫu	- Mẫu bị thất lạc - Đổ mẫu	- Báo cáo lãnh đạo khoa, ghi nhận sự việc, khử nhiễm và liên hệ người bệnh lấy lại mẫu
- Mẫu không đạt	- Sai ống đựng mẫu/Sai mẫu bệnh phẩm - Vận chuyển sai quy định	- Lấy lại mẫu bệnh phẩm

	- Bảo quản sai quy định	- Lấy lại mẫu, đào tạo nhân viên vận chuyển mẫu - Lấy lại mẫu, kiểm tra và hiệu chuẩn thiết bị bảo quản mẫu
--	-------------------------	--

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
- Sai quy trình kỹ thuật	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
- Hóa chất không đạt	- Bảo quản sai/hết hạn	- Chuẩn bị lại hóa chất - Đào tạo nhân viên sử dụng và bảo quản hóa chất.
- Thiết bị dùng đột ngột	- Máy hỏng - Mất điện - Thiếu hóa chất chạy máy	- Sử dụng máy khác cùng chức năng để thực hiện lại xét nghiệm và kiểm tra thiết bị định kỳ, - Đảm bảo nguồn điện ưu tiên và thực hiện lại PCR - Bổ sung hóa chất và khởi động lại máy xét nghiệm
- Nhiễm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật và an toàn sinh học	- Xử lý lại mẫu và thực hiện lại xét nghiệm - Giám sát và kiểm tra chéo
- Lượng DNA không đạt	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo - Không sử dụng đúng dung dịch hòa tan DNA khi căn chỉnh máy đo DNA. - Do tính chất bệnh hoặc thuốc điều trị.	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo - Căn chỉnh lại máy đo bằng dung dịch hòa tan DNA và đo lại. - Lấy lại mẫu

- Đổ DNA	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Thực hiện lại quy trình tách DNA - Kiểm tra và đánh giá nhân viên liên tục
- Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Đào tạo liên tục và kiểm tra chéo
- Sản phẩm PCR không đúng kích thước/không đặc hiệu	- Hóa chất hết hạn sử dụng/không được bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất - Nhầm mẫu - Thao tác của nhân viên chưa đạt/chưa đúng	- Thực hiện lại PCR; đào tạo lại nhân viên trong bảo quản và sử dụng hóa chất. - Lấy lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Đào tạo và kiểm tra liên tục -
- Mẫu nội kiểm không đạt	- Sử dụng sai mẫu nội kiểm - Sai chu trình nhiệt - Sai mẫu bệnh phẩm	- Chọn lại mẫu nội kiểm và thực hiện lại kỹ thuật - Thực hiện lại PCR - Lấy lại /tách lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
- PCR không có sản phẩm	- Hóa chất hết hạn/bảo quản sai quy định - Nồng độ hóa chất không đúng - Nhân viên không tuân thủ quy trình - Mất điện - Máy hỏng	- Kiểm tra hóa chất trước khi sử dụng, pha lại PCR - Đào tạo và giám sát nhân viên, pha lại PCR - Đào tạo và kiểm tra liên tục và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Thực hiện lại PCR - Sửa máy và thực hiện lại PCR
- Sai thang chuẩn	- Nhân viên chưa được đào tạo/không tập trung	- Chọn lại thang chuẩn và điện di lại sản phẩm PCR

- Không có sản phẩm sau điện di	- Sai chu trình nhiệt - Sai điện cực điện di - Dung dịch đệm không đạt	- Thực hiện lại PCR - Điện di lại - Chuẩn bị lại dung dịch đệm và điện di lại
- Không có sản phẩm tinh sạch sau điện di	- Nhân viên không tuân thủ quy trình - Sai điện cực điện di - Dung dịch đệm không đạt	- Thực hiện PCR và tinh sạch lại. - Điện di lại - Chuẩn bị lại dung dịch đệm và điện di lại
- Phân tích và nhận định sai kết quả	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Phân tích lại, đào tạo lại nhân viên, kiểm tra chéo kết quả.
- Trình tự gen không đạt	- Lượng DNA khuôn quá ít/nhiều - Hóa chất điện di mao quản quá hạn - Thao tác nhân viên	- Tiến hành lại phản ứng PCR - Thay hóa chất điện di mao quản hoặc thay mao quản - Đào tạo lại nhân viên và kiểm tra, giám sát
- Không có trình tự gen	- Sai phương pháp chạy - Sai trình tự mẫu - Thao tác nhân viên	- Chọn lại phương pháp chạy - Pha lại hóa chất PCR và/hoặc giải trình tự gen - Đào tạo lại nhân viên và kiểm tra, giám sát

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
- Sai thông tin người bệnh	- Nhân viên không tuân thủ quy trình - Do nhập liệu sai trên hệ thống của bệnh viện	- Đối chiếu thông tin người bệnh với hồ sơ xét nghiệm và sửa lại thông tin . - Liên hệ CNTT hỗ trợ sửa thông tin người bệnh và in lại kết quả xét nghiệm
- Báo cáo sai kết quả xét nghiệm	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Thực hiện lại quy trình kỹ thuật nếu cần. - Phân tích và nhận định lại

		- Kiểm tra chéo kết quả
- Nhầm/mất kết quả xét nghiệm	- Nhân viên để sai vị trí lưu kết quả - Nhân viên trả nhầm cho người bệnh khác - Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Báo cáo lãnh đạo và lấy lại mẫu để thực hiện lại xét nghiệm - Đào tạo lại nhân viên

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Giá trị báo động/nguy hiểm:
 - + Lượng DNA tổng số < 10 ng/ μ L, độ tinh sạch ($OD_{260/280nm}$) ngoài khoảng từ 1,8-2,0.
 - + Hóa chất hết hạn sử dụng
 - + Kết quả điện di mao quản không có tín hiệu
- Tiêu chuẩn đánh giá: mẫu đạt khi đảm bảo các yêu cầu sau
 - + Mẫu trắng (BC) không có băng sau khi PCR.
 - + Các mẫu chứng nội kiểm có kích thước đúng kích thước lý thuyết.
 - + Sản phẩm PCR được điện di cùng thang chuẩn phù hợp, rõ ràng.
 - + Thang DNA phù hợp với kích thước sản phẩm PCR.
 - + Tín hiệu các nucleotide trong giới hạn cho phép, chân không bị nhiễu.
 - + Mẫu nội kiểm PCR có băng đúng kích thước lý thuyết.
 - + Chất lượng tín hiệu chạy điện di mao quản đạt yêu cầu.
 - + Phân tích và kiểm tra chéo trước khi phê duyệt kết quả.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Li MM, Cottrell CE, Pullambhatla M, Roy S, et al. 2023. "Assessments of Somatic Variant Classification Using the Association for Molecular Pathology/American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guidelines: A Report from the Association for Molecular Pathology". J Mol Diagn. 25(2):69-86.
2. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 2001. "Molecular Cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
3. Trần Đức Phần và cs. 2021. "Di truyền Y học". Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

4. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. 1988. “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*”. 239(4839):487-91.
5. Mullis KB. 1990. “Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction”. *Ann Biol Clin (Paris)*. 48(8):579-82.
6. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
7. Tiêu chuẩn ISO 15189:2022.
8. Hướng dẫn HGVS: <https://hgvs-nomenclature.org/>.

16. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm được thực hiện nhằm phát hiện và xác định các biến thể/ đột biến gen liên quan đến bệnh lý di truyền hoặc ung thư cũng như các bệnh khác phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng, điều trị bệnh hoặc nghiên cứu và sàng lọc nguy cơ bệnh di truyền trong gia đình hoặc quần thể bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS-Next Generation Sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Giải trình tự gen là kỹ thuật xác định trình tự DNA của các gen cụ thể, mã hoá hoặc không mã hoá cho các protein chức năng cụ thể. Giải trình tự gen thế hệ mới (Next-Generation Sequencing, NGS) là công nghệ cho phép giải mã đồng thời hàng triệu DNA cùng lúc, qua đó giúp nâng cao hiệu suất của quá trình giải mã hệ gen người. Công nghệ giúp khắc phục một số nhược điểm của giải trình tự gen truyền thống: thời gian đọc nhanh hơn, dữ liệu đầu ra lớn, tiết kiệm chi phí. NGS có nhiều ứng dụng trong y học, bao gồm chẩn đoán bệnh, xác định bộ gen của một loài và nhận biết các biến thể gen quan trọng liên quan đến sự phát triển, sức kháng và tiến hóa của các loài, xác định nguồn gốc của các biến thể gen, khám phá quy luật di truyền, và nghiên cứu sự tương tác giữa các gen; trong thú y và nông nghiệp...

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Ống đựng máu chứa chất chống đông K2 EDTA;
- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;
- Lam kính;
- Lưỡi dao mổ;
- Ống falcon 15mL;
- Ống falcol 50 mL;
- Đầu côn 10 µl có lọc;

- Đầu côn 20 µl có lọc;
- Đầu côn 200 µl có lọc;
- Đầu côn 1mL có lọc;
- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 2,0 mL tiệt trùng;
- Ống PCR 0,2 mL;
- Ống chuyên dụng đo Qubit 0,5mL;
- Cồn chuyên dụng dùng trong sinh học phân tử;
- Xylene;
- Hóa chất tinh sạch thư viện;
- Nước tinh sạch chuyên dùng trong sinh học phân tử;
- Giấy đo pH;
- Tween 20;
- Kit tách ctDNA, DNA/RNA;
- Kit phát hiện đột biến gen (chuẩn bị thư viện) bằng kỹ thuật NGS;
- Bộ kit xác định nồng độ DNA/RNA;
- Kit kiểm tra tính toàn vẹn của DNA/RNA tổng số;
- Kit kiểm tra kích thước thư viện;
- Kit chạy máy NGS;
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet bán tự động có thể điều chỉnh 1 - 10µl, 10 - 100µl, 200 - 1000µl;
- Tủ thao tác PCR;
- Tủ lạnh 4°C;
- Tủ lạnh -20°C;
- Giá để ống;
- khay giữ lạnh;
- Thùng rác đựng đầu côn và hoá chất;
- Máy ly tâm;
- Máy vortex;
- Máy Spin down;
- Máy đo nồng độ DNA;

- Tủ An toàn sinh học;
- Máy cắt tiêu bản;
- Máy PCR;
- Hệ thống điện di kiểm tra kích thước thư viện;
- Hệ thống NGS.

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô đã được cố định và vùi nền (FFPE); mẫu mô tươi, mẫu máu, mẫu dịch cơ thể khác...
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.
- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu (đối với mẫu máu/dịch cơ thể).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định, ví dụ một số thông tin chung như: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, kết quả chẩn đoán giải phẫu bệnh (nếu có) ...

2.6. Thời gian thực hiện xét nghiệm

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng từ 120 giờ đến 168 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo an toàn cho người thực hiện xét nghiệm, dự phòng nguy cơ trước, trong và sau xét nghiệm.
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- An toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Đảm bảo đầy đủ bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất.
- Đảm bảo an toàn sinh học.
- Đảm bảo các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Lập biểu mẫu:

Lập danh sách mẫu xét nghiệm và điền các bước thực hiện xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật NGS.

4.2. Chuẩn bị môi trường làm việc

- Khử nhiễm dụng cụ, thiết bị, bề mặt, không gian làm việc;
- Kiểm tra và chuẩn bị đủ vật tư tiêu hao và dụng cụ cần thiết.

4.3. Chuẩn bị mẫu DNA/RNA

- Quy trình tách chiết để thu được DNA/RNA, ctDNA tinh sạch theo Kit tách DNA/RNA, ctDNA.

- Đánh giá nồng độ và chất lượng DNA/RNA, ctDNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm bằng thiết bị hoặc phương pháp định lượng phù hợp (ví dụ: Qubit, NanoDrop....).

- Lấy các mẫu DNA/RNA, ctDNA đã tách mà đạt yêu cầu về nồng độ và độ tinh sạch sẽ được chuyển sang bước chuẩn bị thư viện để giải trình tự gen.

4.4. Thực hiện kỹ thuật NGS:

4.4.1. Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Bao gồm các bước sau:

- Nạp mẫu DNA hoặc cfDNA/ctDNA hoặc RNA sau tách chiết vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm/ bảng gen (gene panel) trên phần mềm điều khiển hệ thống.

- Hệ thống thực hiện tự động các bước: khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn chỉ số (index) và adapter. Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện. Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể/ đột biến gen.

- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo. Lập báo cáo kết quả.

4.4.2. Đối với NGS thủ công/ bán tự động

Tùy theo từng hãng và từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhưng về cơ bản sẽ bao gồm các bước chung như sau:

- Tạo thư viện: DNA/RNA, ctDNA cần giải trình tự được tách chiết và cắt thành các mảnh nhỏ (nếu cần), khuếch đại qua PCR. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và gắn các adapter cần thiết. Sản phẩm ghép nối được khuếch đại thư viện và tinh sạch sử dụng cho quá trình giải trình tự. Thư viện được kiểm tra và đánh giá chất lượng, nồng độ.

- Tạo cluster: mỗi sợi DNA được giữ lại trên bề mặt thiết bị giải trình tự (flowcell) bằng adapter đã được gắn trước đó. Mỗi sợi DNA sau khi được khuếch đại sẽ tạo thành một cụm DNA (cluster) có trình tự giống hệt nhau để sử dụng cho quá trình giải trình tự.

4.4.2. Nạp thư viện và giải trình tự.

Giải trình tự: Sản phẩm được đưa lên hệ thống NGS theo hướng dẫn của kit chuyên dụng.

4.4.3. Phân tích dữ liệu và báo cáo kết quả.

- + Kết quả từ quá trình giải trình tự được phân tích dựa trên phần mềm chuyên dụng được thiết kế dành riêng cho bộ kit.

- + Kiểm tra mẫu chứng, sau đó phân tích các mẫu xét nghiệm.

- + Phiên giải kết quả, phân loại biến thể đột biến, độ sâu phân tích.

- + Đối chiếu biến thể phân tích với các cơ sở dữ liệu về gen trên thế giới.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:

- + Thực hiện lấy lại mẫu;

- + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.

- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng:

- + Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình;

- + Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.

5.2 Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:

- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm;

- + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.

- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm;
- + Kiểm tra lại chất lượng DNA/RNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3 Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả
- + Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
- + Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm.
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
3. Boycott, K., Vanstone, M., Bulman, D. et al. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. Nat Rev Genet 14, 681-691 (2013).
4. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. Cancer Biol Med. 2019; 16(1): 4-10.

17. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT DNA MICROARRAY

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật DNA microarray được sử dụng để phân tích đồng thời số lượng lớn các trình tự DNA nhằm phát hiện và xác định bất thường số lượng bản sao (CNV-Copy Number Variation), phát hiện các biến thể đơn nucleotide (SNV-Single nucleotide variants) và các biến thể di truyền khác như mất đoạn, lặp đoạn, bất thường vi mất đoạn/lặp đoạn... trên toàn bộ bộ gen để phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh, hỗ trợ tư vấn di truyền, nghiên cứu y sinh học....

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

- DNA microarray dựa trên đa hình đơn nucleotide (SNP) và lai bộ gen so sánh (CGH), là một kỹ thuật lý nhằm nhận dạng biến thể đơn nucleotid, biến thể cấu trúc hay sự thay đổi trong biểu hiện gen và sự methyl hóa.

- Kỹ thuật lai so sánh hệ gen (aCGH) là kỹ thuật di truyền dựa trên việc so sánh 2 hệ gen (mẫu đối chứng và mẫu nghiên cứu) để phát hiện các số lượng bản sao của các biến thể (Copy number variants-CNVs). Mỗi một hệ gen được lai với 1 màu huỳnh quang khác nhau.

1.2.2. Nguyên lý

- Nguyên lý hoạt động của microarray là sự lai giữa hai chuỗi DNA dựa trên đặc tính của trình tự acid nucleic là bắt cặp bổ sung một cách đặc hiệu với chuỗi còn lại do hình thành liên kết hydro giữa các cặp bazơ nitơ bổ sung.

- Kỹ thuật lai hệ gen so sánh (aCGH...) được thực hiện trên tiêu bản kính (DNA chip) có chứa khoảng trình tự đầu dò DNA (60K, 180K...) để nhận diện vị trí hệ gen trong bộ NST. Kỹ thuật aCGH có khả năng phát hiện các CNV cũng như các đột biến mất/lặp đoạn trên NST ở dạng không cân bằng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Đầu côn thường và đầu côn có phin lọc (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 10 μ L); Ống ly tâm 1,5-2 mL; ống PCR các thể tích (0,2-0,5 mL); Gasket; khay rửa tiêu bản lai; Đồng hồ bấm giây; Thanh khuấy từ

- Khay giữ mẫu các loại (24-48 vị trí): khay giữ lạnh, khay giữ ống 0,5 mL-2mL-15mL-50mL; Bàn thí nghiệm; tủ đựng hóa chất; hộp lưu mẫu; giấy lau máy và lau tay.

- Ống đựng bệnh phẩm (ống chống đông EDTA, ống đựng mẫu vô trùng...); găng tay; khẩu trang; mũ giấy; sát khuẩn tay nhanh.

- Chi phí khác: chi phí phần mềm nội bộ của bệnh viện, chi phí hiệu chuẩn trang thiết bị hoặc chi phí đánh giá ISO (nếu có)...

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Hóa chất dùng chung: nước không chứa Nuclease; ethanol 100%.

- Bộ mẫu chứng gồm mẫu chứng không có đột biến, mẫu chứng âm và dương các loại (nếu có).

- Hóa chất tách DNA: kit tách DNA tổng số, ethanol 100% và 70%.

- Hóa chất điện di: thạch điện di (Agarose); đệm màu tra mẫu điện di (Loading dye) (nồng độ 5X/6X/10X...); dung dịch đệm điện di (TBE, TAE...); thuốc nhuộm huỳnh quang (Ethidium Bromide, Redsafe...); thang đo DNA (1 kb, 100 bp...); nước cất 2 lần.

- Dung dịch đệm (TE 10X...)

- Hóa chất lai (Sure Tag DNA Labeling kit, Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization kit ...).

- DNA tham chiếu (nam và nữ); Cot-1 DNA (1,0mg/mL); hóa chất đệm rửa lam, lam đệm.

- Bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet với các thể tích: 0,1-1 μ L; 1-10 μ L; 1-20 μ L; 10-200 μ L; 0,1-1 mL; Tủ sạch/Tủ ATSH cấp 1/Tủ ATSH cấp 2, Tủ hút.

- Máy đọc quang phổ quét vi dây, Tủ lai phân tử, Hệ thống phân tích dữ liệu CGH; Máy đo quang phổ; Máy cô đặc DNA.

- Máy luân nhiệt PCR 96 giếng, máy tách DNA tự động; máy quang phổ đo DNA/RNA, hệ thống điện di, hệ thống chụp ảnh điện di kèm phần mềm.

- Máy ly tâm: máy ly tâm thường; máy ly tâm lạnh; máy ly tâm mini spin; máy ly tâm đĩa; Tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C ; -40°C ; -80°C ...).

- Thiết bị phụ trợ: máy khuấy từ gia nhiệt, máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; nồi khử trùng ướt; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh; máy in tem mã vạch.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi; dòng tế bào dịch ối sau nuôi cấy; các bệnh phẩm khác: nước bọt, niêm mạc má, mẫu u, gai rau, DNA tổng số, sản phẩm PCR.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:

- + Máu ngoại vi: 0,5-2 mL, đựng trong ống EDTA vô trùng.

- + Các bệnh phẩm khác: gai nhau, mô, tế bào niêm mạc má, mẫu u đựng trong ống đựng mẫu vô trùng.

- + DNA tổng số, sản phẩm PCR: lượng DNA tối thiểu 25 ng/ μL .

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.

- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

34,5 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học: mặc áo vô trùng, đeo khẩu trang, kính bảo hộ, mũ bảo hộ, găng tay khi thực hiện xét nghiệm.

- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất, thiết bị.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung cho các bước thực hiện xét nghiệm:

- + khay giữ lạnh; khay đựng ống 1,5 mL và ống PCR, bút viết.

- + Găng tay, cồn tuyệt đối và cồn 70°C , sát khuẩn tay nhanh, đăng kí sử dụng tủ an toàn sinh học và máy luân nhiệt PCR, máy giải trình tự gen.

- + Ghi tên người bệnh/mã số người bệnh lên các ống PCR hoặc ống ly tâm.
- + Phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có); tính tổng số hóa chất cần pha để thực hiện 1 lần xét nghiệm hoặc xét nghiệm cho 1 mẫu bệnh phẩm.
- Các bước được thực hiện bởi 1 nhân viên chính và 1 nhân viên giám sát.

4.1.1. Tách DNA tổng số

DNA tổng số có thể thực hiện theo 2 cách: tách bằng kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tách thủ công sử dụng các loại hóa chất tương đương như enzyme protease, hóa chất tẩy rửa mạnh (SDS...), dung dịch đệm ly giải, cồn.... Các bước thực hiện như sau:

- Biến tính và phân giải protein: thêm lượng mẫu cần thiết vào ống đã chứa enzyme hoặc hóa chất tương đương nhằm phá màng tế bào và màng nhân; bổ sung dung dịch đệm (nếu cần), trộn đều và ủ ở nhiệt độ phù hợp.
- Loại bỏ protein: protein sau biến tính sẽ được kết tủa và phân lớp hoặc giữ lại trên cột lọc.
- Thu axit nucleic: sử dụng cồn hoặc hóa chất tương đương để tủa DNA hoặc hòa tan DNA và được thu lại bằng cách ly tâm ở tốc độ phù hợp. DNA được hòa tan trong dung dịch phù hợp (nước khử enzyme hoặc dung dịch tương đương) và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Kiểm tra chất lượng DNA tổng số bằng điện di hoặc quang phổ kế.

4.1.2. Cắt enzyme giới hạn

Pha hỗn hợp enzyme cắt theo khuyến cáo của nhà sản xuất:

Hóa chất	Thể tích/mẫu (μL)
Nước Nuclease-Free	
Dung dịch đệm cho enzyme cắt	
BSA	
Alu I	
Rsa I	
Tổng số	

- + Nhỏ thể tích cần thiết DNAs (ví dụ 10μL...) vào các ống chứa hỗn hợp enzyme cắt.
- + Đặt các ống vào máy PCR và chạy chu trình nhiệt theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4.1.3. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị dung dịch đệm 1X
- Chuẩn bị bản thạch agarose với nồng độ thích hợp.
- + Lắp lược vào các khay đổ thạch và điều chỉnh khay cân bằng.
- + Cân lượng thạch agarose cần thiết, và bổ sung dung dịch đệm với thể tích tương ứng với nồng độ thạch cần dùng và đun nóng dung dịch thạch cho đến khi toàn bộ agarose trong dung dịch tan hoàn toàn.
- + Làm nguội dung dịch đến khoảng 50-70°C và thêm 5µL thuốc nhuộm trong 100mL dung dịch agarose, lắc đều (trường hợp không bổ sung thuốc nhuộm DNA, sau điện di bản thạch sẽ ngâm trong dung dịch thuốc nhuộm DNA) rồi đổ dung dịch thạch agarose vào khuôn đã được cài sẵn lược, để bản thạch nguội ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút.
- Điện di sản phẩm PCR
- + Khi thạch nguội, nhắc lược ra khỏi bản thạch, và đặt vào bể điện di.
- + Đổ dung dịch đệm 1X vào bể điện di sao cho dung dịch đệm cao hơn mặt bản thạch khoảng 2-5 mm.
- + Dùng pipet hút 1 thể tích thuốc nhuộm và trộn đều với 5 thể tích sản phẩm PCR. Sau đó, dùng pipet hút toàn bộ mẫu và nhỏ mẫu vào từng giếng trên bản thạch.
- + Đậy nắp bể điện di và cắm điện cực vào nguồn điện di và điện di mẫu trong khoảng thời gian và điện thế phù hợp.
- Chụp ảnh sản phẩm điện di: đưa bản thạch vào máy chụp ảnh gel, đóng nắp, bật đèn UV và chụp theo hướng dẫn của nhà sản xuất; lưu hình ảnh điện di hoặc in ảnh (nếu cần); vệ sinh các dụng cụ điện di bằng cồn 70°C.

4.1.4. Đánh dấu huỳnh quang

- Ly tâm hỗn hợp sau cắt enzyme ở 6,000 g x 1 phút
- Bổ sung hỗn hợp môi vào ống chứa hỗn hợp cắt enzyme, trộn đều hỗn hợp và thực hiện chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất và bảo quản dung dịch ở 4°C cho đến khi thực hiện đánh dấu huỳnh quang.
- Chuẩn bị hỗn hợp đánh dấu huỳnh quang (Labelling Master mix-LMM...), giữ lạnh sau khi pha hỗn hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.5. Tinh sạch sản phẩm DNA sau đánh dấu huỳnh quang

- Ly tâm mẫu đã đánh dấu huỳnh quang ở điều kiện 6,000 x g trong 1 phút

- Tinh sạch sản phẩm đánh dấu huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tiến hành đo mức độ gắn huỳnh quang và độ gắn huỳnh quang đặc hiệu sau tinh sạch.

4.1.6. Lai vi dây

- Trộn đều mẫu đối chứng và mẫu bệnh đã tinh sạch sau đánh dấu huỳnh quang vào ống 1,5 mL.

- Chuẩn bị hỗn hợp lai theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4.1.7. Rửa slide sau ủ

- Chuẩn bị dung dịch để rửa slide theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Rửa slide theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.8. Quét mẫu trên máy và phân tích kết quả

- Đặt slide đã rửa vào khay giữ slide trên máy quét mẫu và thực hiện quét slide theo trình tự hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Sau khi hoàn tất quét slide, lưu hình ảnh có định dạng theo quy định và chuyển sang máy vi tính có chứa phần mềm phân tích kết quả trên phần mềm chuyên dụng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả QC

a. Tách DNA

Nồng độ DNA tổng số được đo trên máy quang phổ đo DNA/RNA từ 30-50ng/μl và độ tinh sạch $OD_{260/280nm}$ từ 1,8-2,0 và $OD_{260/230nm} > 1$.

b. Điện di

- Cách thức phân tích kết quả: Vị trí của DNA được xác định dựa vào thang DNA chuẩn để ước lượng kích thước của sản phẩm PCR. Băng điện di trên bản thạch phát hiện thấy dưới ánh sáng UV.

- Các băng điện di trên thang DNA chuẩn được sử dụng để đối chiếu với kích thước sản phẩm PCR của người bệnh và nhận định kết quả chỉ khi đạt được độ sáng rõ ràng, băng không bị đứt gãy.

c. Lai

Lượng DNA và hoạt độ huỳnh quang đo được sau bước gắn huỳnh quang và tinh sạch cần đạt yêu cầu của nhà sản xuất máy và hóa chất đi kèm.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

a. Đọc kết quả

- Phân tích tỉ lệ tín hiệu huỳnh quang đỏ/xanh lục tương ứng tại mỗi vị trí đầu dò để tính ra được tỉ lệ mẫu bệnh/mẫu chứng tương ứng gắn với đầu dò đó, biểu hiện dưới dạng logarit cơ số 2 tỷ số của cường độ bắt màu huỳnh quang giữa mẫu cần phân tích và mẫu đối chứng.

b. Nhận định kết quả

- Đối với mẫu cân bằng về vật liệu di truyền, phân tích và nhận định kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Trường hợp bất thường nhiễm sắc thể giới, cần dựa trên mẫu chứng tương ứng có bao nhiêu bản sao nhiễm sắc thể giới để đưa số bản sao mẫu chứng phù hợp vào công thức tính.

- Trường hợp kết quả log2 (bệnh/chứng) đưa ra các kết quả nằm ngoài các giá trị ở trên, có thể nghi ngờ trường hợp khảm, trường hợp này từ kết quả log2 có thể tính ra tỉ lệ bệnh/ chứng và tỉ lệ khảm.

- Danh pháp của các biến thể được viết theo hướng dẫn của HGVS.

- Nhận định kiểu gen tương ứng (đồng hợp tử, dị hợp tử hoặc không phát hiện đột biến...).

4.2.3. Phiên giải và báo cáo kết quả

- Phiên giải kết quả theo hướng dẫn của ACMG/Clingen.

- Báo cáo kết quả theo các quy trình liên quan.

4.2.4. Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Đối chiếu kết quả kiểu gen và kiểu hình theo quy định.

- Tư vấn di truyền hoặc thực hiện thêm xét nghiệm nếu cần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm (yếu tố nhiễu) và các phản ứng chéo, các chất ảnh hưởng đến xét nghiệm: chất chống đông heparin, người bệnh mới truyền máu hoặc các chế phẩm máu trong vòng 1 tháng...

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật: thực hiện lại quy trình kỹ thuật.
- Hóa chất hết hạn sử dụng và không được bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất hoặc không được trộn đều trước khi chia sang các ống nhỏ hoặc trước khi hút.

- Nhiễm mẫu: tách lại DNA/lấy lại mẫu, và tiến hành lại quy trình kỹ thuật.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Nhầm mẫu bệnh phẩm: lấy lại mẫu bệnh phẩm của người bệnh.
- Thực hiện sai quy trình kỹ thuật: tiến hành lại xét nghiệm.
- Phân tích kết quả không chính xác: kiểm tra và phân tích chéo kết quả xét nghiệm hoặc xin ý kiến của bác sĩ lâm sàng.
- Báo cáo sai kết quả xét nghiệm: thông báo tới lãnh đạo khoa xét nghiệm và sửa lại kết quả xét nghiệm.
- Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả: báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

6.1. Tách DNA tổng số

- Giá trị báo động/nguy hiểm: Nồng độ DNA tổng số được đo trên máy quang phổ đo DNA/RNA dưới 30 hoặc trên 350 ng/ μ l và độ tinh sạch $OD_{260/280nm}$ ngoài khoảng từ 1,8-2,0.
- DNA tổng số không đạt chất lượng: tiến hành tách lại mẫu bệnh phẩm.

6.2. Điện di

- Tiêu chuẩn của sản phẩm điện di:
 - + Thang DNA chuẩn phù hợp với kích thước sản phẩm PCR theo lý thuyết.
 - + Các băng điện di rõ ràng, sắc nét, thang DNA chuẩn tách đều.
 - + Kích thước sản phẩm PCR tương ứng với kích thước lý thuyết.
- Cách xử lý sản phẩm điện di không đạt tiêu chuẩn:
 - + Thang chuẩn không phù hợp: lựa chọn lại thang chuẩn.

+ Tất cả các giếng điện di không có sản phẩm, cần kiểm tra lần lượt các bước như sau: kiểm tra điều kiện điện di; thực hiện lại kỹ thuật điện di; thực hiện lại kỹ thuật PCR.

+ Giếng sản phẩm của người bệnh: khi kích thước băng sản phẩm PCR của người bệnh không đúng kích thước lý thuyết, xét nghiệm cần thực hiện lại; nếu kết quả sau điện di vẫn lặp lại như vậy hoặc không có sản phẩm, cần tách lại DNA, kiểm tra lại môi, chu trình nhiệt, điều kiện điện di.

+ Băng nội kiểm có nhiều băng phụ hoặc mẫu trắng có băng: thực hiện lại xét nghiệm PCR.

6.3. Lại

- Mẫu nội kiểm đạt chất lượng.
- Chất lượng tín hiệu lai đạt yêu cầu của nhà sản xuất máy và hóa chất.
- Phân tích và kiểm tra chéo trước khi phê duyệt kết quả.
- Chất lượng của các mẫu chạy cần đạt ở mức tốt hoặc rất tốt theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Li MM, Cottrell CE, Pullambhatla M, et al. 2023. Assessments of Somatic Variant Classification Using the Association for Molecular Pathology/American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guidelines: A Report from the Association for Molecular Pathology. J Mol Diagn. 25(2):69-86.
2. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
3. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
4. Tiêu chuẩn ISO 15189:2022.
5. Hướng dẫn HGVS: <https://hgvs-nomenclature.org/>

18. XÉT NGHIỆM CÁC BIẾN THỂ GEN ALPHA THALASSEMIA HOẶC BETA THALASSEMIA BẰNG KỸ THUẬT LAI DNA

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến thể gen khác nhau của bệnh alpha thalassemia và beta thalassemia bằng kỹ thuật lai DNA để phục vụ tư vấn và chẩn đoán cho người bệnh và thành viên gia đình người bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý của kỹ thuật lai DNA ngược trong đó các đầu dò đặc hiệu với nhiều đột biến hay đa hình của một gen sẽ được gắn trên thanh lai và lai với gen đã được khuếch đại. Đầu dò được cố định trên thanh lai là một đoạn DNA sợi đơn có ái lực mạnh và đặc hiệu với trình tự gen mục tiêu. Chiều dài của chúng phù hợp cho phản ứng lai, giúp phân biệt DNA với những sai khác rất nhỏ trong trình tự chuỗi DNA. Sản phẩm sau PCR được lai với đầu dò trên màng, các thể lai có thể được phát hiện bằng phản ứng với một cơ chất để tạo thành kết tủa có màu. Xét nghiệm sử dụng các thanh lai với các vị trí đã được gắn đầu dò phát hiện các đột biến gen của bệnh alpha thalassemia hoặc beta thalassemia.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Kit tách chiết DNA;
- Kit đo nồng độ DNA;
- Hóa chất cho phản ứng PCR gen alpha thalassemia;
- Hóa chất cho phản ứng PCR gen beta thalassemia;
- Hóa chất cho phản ứng lai DNA;
- Đệm điện di (TBE hoặc TAE);
- Loading dye;
- Agarose;
- Thuốc nhuộm DNA;
- Thang DNA chuẩn.

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Hệ thống chụp ảnh gel;
- Máy tính có phần mềm chụp ảnh gel;
- Bể ổn nhiệt;
- Bộ lưu điện;
- Máy điện di;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 μ L đến 1000 μ L.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu -20°C;
- Tủ lạnh âm sâu -70°C.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-12 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm Di truyền - Sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

Tách chiết DNA bằng cột silica-gel hoặc bằng hạt từ trên máy tách tự động. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Đo nồng độ DNA

Đo nồng độ và đánh giá độ tinh sạch của DNA ở bước sóng 260nm và 280nm, hoặc sử dụng chất chỉ thị màu gắn DNA đối với máy đo huỳnh quang.

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp môi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1 - 2 giây.
- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.
- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).
- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).
- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.
- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.
- Khi chương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng ra khỏi máy luân nhiệt.
- Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bao quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.4. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị bản gel agarose ở nồng độ thích hợp.
- Nhỏ mẫu vào các vị trí tương ứng trên bản gel, nhỏ mẫu DNA chuẩn (DNA ladder) tương thích.
- Tiến hành điện di ở thời gian và điều kiện điện thế phù hợp.
- Chụp ảnh bản gel và chú thích tên mẫu, ngày xét nghiệm, loại xét nghiệm.

4.1.5. Lai DNA

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

4.2. Nhận định kết quả

- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các mẫu đối chứng trong phản ứng đạt yêu cầu.
- Phân tích kết quả mẫu xét nghiệm dựa vào kích thước của các băng hiển thị trên thanh teststrip. Nhận biết đột biến ở các vị trí vạch trên thanh theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR
▪ Các tín hiệu trên thanh lai không đặc hiệu	▪ Lưu ý thực hiện các bước rửa đầy đủ theo quy trình, kiểm soát số lượng mẫu đủ để các mẫu được thực hiện đồng thời

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Puehringer, Helene, et al. Validation of a reverse-hybridization StripAssay for the simultaneous analysis of common α -thalassemia point mutations and deletions. 2007: 605-610.
2. Winichagoon P, Kumpan P, Holmes P et al. Validation of the immunochromatographic strip for α -thalassemia screening: A multicenter study. Translational Research. 2015; 165(6):689-95.
3. Soliman OE, Yahia S, Shouma A et al. Reverse hybridization StripAssay detection of β -thalassemia mutations. Hematology. 2010;15(3):182-6.
4. Munkongdee T, Chen P, Winichagoon P et al. Update in laboratory diagnosis of thalassemia. Frontiers in molecular biosciences. 2020;7:74.
5. Aliyeva G, Asadov C, Mammadova T et al. Thalassemia in the laboratory: pearls, pitfalls, and promises. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2018;57(2):165-74.

19. XÉT NGHIỆM BIẾN THỂ CÁC GEN GLOBIN BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến đổi di truyền trên gen globin liên quan đến bệnh thalassemia để phục vụ chẩn đoán và tư vấn cho người bệnh và thành viên gia đình người bệnh.

1.2. Nguyên lý

Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (Next-Generation Sequencing, NGS) dựa trên phản ứng tổng hợp kéo dài chuỗi (sequencing by synthesis) sử dụng các nucleotide gắn huỳnh quang. Đoạn trình tự cần giải được tạo cầu tổng hợp (bridge amplification), tạo cụm (cluster generation). Quá trình giải trình tự được diễn ra theo chiều xuôi và chiều ngược. Mỗi loại nucleotit sử dụng trong phản ứng giải trình tự được đánh dấu được gắn huỳnh quang khác nhau và được phát hiện bằng hệ thống quang học. Từ đó, xét nghiệm cho phép xác định chính xác trình tự nucleotit trên chuỗi DNA của mẫu. Việc so sánh trình tự chuỗi DNA của người bệnh với trình tự chuỗi DNA tham chiếu sẽ phát hiện được các biến thể di truyền trên các gen globin.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Thành phần	Điều kiện bảo quản
Kit tách DNA	Các thành phần theo bộ kit sử dụng	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Hóa chất chạy PCR	Các cặp mồi đặc hiệu	-20°C
	Hóa chất cho phản ứng PCR	-20°C
Hóa chất điện di	Agarose	22-25°C
	Loading dye	22-25°C
	DNA ladder	22-25°C

Hóa chất, sinh phẩm	Thành phần	Điều kiện bảo quản
	Chất nhuộm DNA	22-25°C
Hóa chất giải trình tự gen	Hạt từ	-15°C đến -25°C
	Hoá chất đo nồng độ DNA	-15°C đến -25°C
	Kit tạo thư viện DNA	-15°C đến -25°C
	Kit giải trình tự gen	-15°C đến -25°C
	Kit đánh dấu mẫu (code)	-15°C đến -25°C

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống giải trình tự gen NGS;
- Máy tính có phần mềm phân tích dữ liệu giải trình tự;
- Máy PCR;
- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm mini;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu -20°C;
- Tủ lạnh âm sâu -70°C.
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 µL đến 1000 µL.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 2mL máu toàn phần chống đông EDTA. Bảo quản mẫu ở 2 - 8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 72 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 80 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA từ máu toàn phần

Tách chiết DNA bằng cột silica-gel hoặc bằng hạt từ trên máy tách tự động. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Khuếch đại gen globin bằng phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp môi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1 - 2 giây.
- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.
- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).
- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).
- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.
- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.
- Khi trương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng ra khỏi máy luân nhiệt.
- Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bảo quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.3. Điện di sản phẩm PCR

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose ở nồng độ phù hợp với kích thước sản phẩm.

4.1.4. Tinh sạch sản phẩm PCR

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Giải trình tự

Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Thường bao gồm các bước như sau:

- Nạp mẫu DNA hoặc sản phẩm PCR...vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm trên phần mềm điều khiển tự động.

- Hệ thống thực hiện tự động các bước: Khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn index và adapter; Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện; Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể gen.

- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo. Lập báo cáo kết quả.

Đối với hệ thống NGS thủ công/ bán tự động

Tùy theo từng hãng và từng bộ kit sẽ có quy trình chi tiết khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhưng về cơ bản sẽ bao gồm các bước như sau:

Chuẩn bị thư viện giải trình tự

- Đo và chuẩn hóa nồng độ DNA. Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit.

- Pha loãng các mẫu đến nồng độ 0,2 ng/μL bằng dung dịch EB

Phân mảnh DNA

Thực hiện phân mảnh DNA sử dụng enzym cắt ngẫu nhiên thành các đoạn ngắn theo chiều dài mong muốn (150-600bp). Các bước kỹ thuật thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit.

Gắn mã phân biệt cho thư viện DNA

- Rửa đông hóa chất PCR và các index ở nhiệt độ phòng trong khoảng 5 đến 10 phút, nhẹ nhàng đảo thuận nghịch các ống 3-5 lần.

- Sắp xếp các ống index trên khay theo thứ tự hàng dọc và ngang tương ứng.

- Thêm 15 μL mastermix vào từng ống, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.

- Thêm 5 µL index 2 vào từng ống theo cột, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.

- Thêm 5 µL index 1 vào từng ống theo hàng, hút nhả pipet 5 lần, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.

- Loại bỏ tất cả các nắp đã dùng và thay bằng nắp mới được cung cấp theo bộ kit.

- Đậy nắp các ống và ly tâm nhanh trong 3 đến 5 giây.

- Tiến hành phản ứng PCR để gắn index theo chu trình nhiệt sau:

72°C 3' - 95°C 30" - 95°C 10" - 55°C 30" - 72°C 30" x12 - 72°C 5' - 10°C forever.

Lưu ý: nếu chưa sử dụng sản phẩm PCR, có thể bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8°C trong 2 ngày.

Tinh sạch sản phẩm thư viện DNA

- Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Quy đổi nồng độ các mẫu từ đơn vị ng/µL sang đơn vị nM theo công thức như sau:

$$X = \frac{Y \times 1000000}{M \times 650}$$

X: Nồng độ (nM) của mẫu

Y: Nồng độ (ng/µL) của mẫu

M: kích thước đoạn DNA

- Pha loãng nồng độ các mẫu về 4 nM sử dụng đệm EB.

Chạy giải trình tự gen

a. Chuẩn bị hóa chất

- Rã đông hóa chất giải trình tự gen, để ở nhiệt độ phòng.

- Rã đông khay hoá chất bằng cách ngâm mặt dưới của khay trong nước trong thời gian > 60 phút.

- Chuẩn bị NaOH 0,2N pha loãng từ NaOH 1N.

b. Thực hiện

- Sử dụng 1 ống Ly tâm đáy nhọn ghi tên là PAL (Pooled Amplicon Library).

- Chuyển 10 µL của mỗi mẫu trong mỗi ống đã pha loãng về nồng độ 4nM vào ống PAL.

- Sử dụng 1 một ống ly tâm đáy nhọn mới ghi tên là DAL (Diluted Amplicon Library).

- Chuyển 5 μL hỗn hợp các mẫu đã trộn trong ống PAL sang ống DAL.

- Thêm 5 μL NaOH 0,2N.

- Trộn nhẹ, ly tâm nhanh ống DAL từ 3 đến 5 giây, và ủ ống DAL ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

- Thêm 990 μL HT1 (Hybridization Buffer) vào ống DAL, hút nhả pipet để pha loãng nồng độ các mẫu về 20 pM.

- Pha loãng nồng độ các mẫu trong ống DAL về nồng độ phù hợp theo công thức như sau:

Nồng độ	6 pM	8 pM	10 pM	12 pM	15 pM	20 pM
DAL(μL)	180	240	300	360	450	600
HT1 (μL)	420	360	300	240	150	0

- Đưa toàn bộ hỗn hợp đã pha loãng vào khay hoá chất theo vị trí mẫu trên khay.

- Đặt khay vào vị trí trên máy NGS và chạy theo chương trình phù hợp.

4.2. Nhận định kết quả

Dữ liệu giải trình tự gen được phân tích trên các phần mềm chuyên biệt như Miseq reporter, IGV, CLC cancer research workbench.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Vấn đề	Nguyên nhân	Cách khắc phục
DNA không tinh sạch, lẫn ARN.	- Lượng tế bào bạch cầu quá nhiều so với cỡ cột tách; - Bước rửa không thực hiện tốt.	- Điều chỉnh lượng tế bào ban đầu theo mức phù hợp với cột; - Tăng thêm 1 bước rửa.
Tổng hợp gen đích không thành công	- Môi không đủ đặc hiệu; - Nồng độ các thành phần phản ứng không phù hợp; - Chưa tối ưu nhiệt độ.	- Kiểm tra lại môi, nồng độ các thành phần phản ứng và tiến hành chạy gradient

Vấn đề	Nguyên nhân	Cách khắc phục
		nhiệt độ tối ưu nhiệt độ phản ứng;
Kết quả đọc trình tự bị nhiễu	- Thư viện DNA không đạt đủ độ tinh sạch; - Biến tính chưa hoàn toàn; - Bước gắn barcode không thành công; - Lượng thư viện đưa vào quá nhiều; - Nhiễm chéo giữa các mẫu.	- Kiểm tra bước tinh sạch và chuẩn hoá thư viện; - Đảm bảo nhiệt độ và thời gian biến tính; - Kiểm tra bước gắn barcode theo quy trình chuẩn; - Kiểm soát lượng thư viện đưa vào đọc trình tự; - Đánh số và thay đầu cón sau khi thao tác với mỗi mẫu để loại bỏ nhiễm chéo.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Đánh giá chất lượng: chất lượng mẻ chạy giải trình tự đạt yêu cầu khi đạt được các chỉ số: Q30 > 70%; mật độ cụm: > 500K/mm²; độ lặp bao phủ: > 100.
- Độ bao phủ (coverage) tối thiểu cần đạt là 30x

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. Scand J Clin Lab Invest 2007; 67: 71-86
2. Najmabadi H, Teimourian S, Khatibi T et al. Amplification refractory mutation system (ARMS) and reverse hybridization in the detection of beta-thalassemia mutations. Arch Inn Med 2001; 4: 165-170.
3. Delague V, Kriegshauser G, Oberkanins C, Me´garbane´ A. Reverse hybridization vs. DNA sequencing in the molecular diagnosis of Familial Mediterranean fever. Genet Test 2004; 8: 65-68
4. Quy trình tách RNA từ dịch cơ thể (máu toàn phần, dịch tủy xương,...) của QIAGene: RNeasy_Mini_Handbook;

5. Quy trình PCR và RT-PCR của Invitrogen: Superscript onestep RT-PCR manual;
6. Quy trình tách chiết và tinh sạch sản phẩm PCR từ gel agarose của QIAGene: MinElute Handbook;
7. Quy trình đo nồng độ thư viện bằng Qubit: Qubit 2.0 Fluorometer manual;
8. Quy trình định lượng nồng độ thư viện bằng RQ-PCR của KAPA: KAPA Library Quantification for Illumina;
9. Quy trình chuẩn bị thư viện giải trình tự của Illumina: Illumina Nextera XT library preparation protocol;
10. Quy trình đọc trình tự gen trên hệ thống MiSeq: Illumina MiSeq operation manual.
11. Các tài liệu chuẩn khác về thao tác với mẫu dịch cơ thể, DNA/ARN, PCR, RT-PCR, real-time PCR, RQ-PCR, đo nồng độ DNA/ARN,...
12. Tài liệu hướng dẫn sử dụng phần mềm MiSeq reporter của Illumina: Illumina MiSeq reporter user manual.

20. XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN VIRUS BẰNG KỸ THUẬT PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xác định sự hiện diện của virus gián tiếp thông qua phát hiện các vật liệu di truyền (DNA hoặc RNA) của virus đó bằng kỹ thuật PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

PCR (Polymerase Chain Reaction) là một kỹ thuật nhanh chóng và hiệu quả được sử dụng để khuếch đại một đoạn DNA mục tiêu có kích thước nhỏ tạo ra hàng triệu bản sao của DNA. Nói cách khác, PCR cho phép tạo ra hàng triệu bản sao của một chuỗi DNA cụ thể từ một mẫu nhỏ ban đầu hay thậm chí là một bản sao duy nhất. PCR được xem là một quá trình quan trọng đối với một loạt các công nghệ di truyền trong nghiên cứu y học và sinh học. Đặc biệt trong các xét nghiệm sinh học phân tử, PCR là 1 quá trình không thể thiếu giúp con người nghiên cứu sâu vào phân tích vật liệu di truyền DNA/RNA đồng thời phát hiện sự có mặt của virus trong các mẫu bệnh phẩm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Ống đựng máu chứa chất chống đông K2 EDTA;
- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;
- Lam kính;
- Lưỡi dao mổ;
- Ống falcon 15mL;
- Ống falcol 50 mL;
- Đầu côn 10 µl có lọc;
- Đầu côn 20 µl có lọc;
- Đầu côn 200 µl có lọc;
- Đầu côn 1mL có lọc;
- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 0,2 mL tiệt trùng;

- Dải ống PCR 0,2 mL;
- Cồn chuyên dụng dùng trong sinh học phân tử;
- Xylene;
- Nước tinh sạch chuyên dùng trong sinh học phân tử;
- Bộ hóa chất điện di sản phẩm PCR;
- Thang chuẩn điện di;
- Kit tách ctDNA, DNA/RNA;
- Bộ kit xét nghiệm phát hiện sự có mặt của Virus;
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi;

2.3. Trang thiết bị

- Pipet bán tự động có thể điều chỉnh 0,1 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 200 - 1000 μ l;
- Tủ thao tác PCR;
- Tủ lạnh 4°C;
- Tủ lạnh -20°C;
- Giá để ống;
- khay giữ lạnh;
- Thùng rác đựng đầu côn và hoá chất;
- Máy ly tâm;
- Máy vortex;
- Máy Spin down;
- Máy đo nồng độ DNA;
- Tủ an toàn sinh học;
- Hệ thống điện di;
- Hệ thống chụp ảnh;
- Máy cắt tiêu bản;
- Máy PCR;

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô; mẫu mô đã được cố định và vùi nền (FFPE); mẫu máu, mẫu phết cổ tử cung; mẫu dịch cơ thể khác.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.

- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu (đối với mẫu máu/dịch cơ thể).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định, ví dụ một số thông tin chung như: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm (nếu có) ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng từ 6 đến 10 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

Phải đảm bảo an toàn về các quy định của bệnh viện:

- Quy định về hiệu chỉnh vật tư, trang thiết bị.
- Quy định về an toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Quy định về an toàn hóa chất.
- Quy định về an toàn sinh học.
- Quy định về kiểm soát môi trường, rác thải y tế.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Lập biểu mẫu

Lập danh sách mẫu xét nghiệm và điền các bước thực hiện xét nghiệm phát hiện virus bằng kỹ thuật PCR.

4.2. Chuẩn bị môi trường làm việc

- Khử nhiễm dụng cụ, thiết bị, bề mặt, không gian làm việc;
- Kiểm tra và chuẩn bị đủ vật tư tiêu hao và dụng cụ cần thiết.

4.3. Chuẩn bị mẫu DNA/RNA

- Quy trình tách chiết để thu được DNA/RNA tinh sạch theo Kit tách DNA/RNA, ctDNA.

- Đánh giá nồng độ và chất lượng DNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm.

- Lấy các mẫu DNA/RNA tách chuẩn bị cho xét nghiệm phát hiện virus bằng kỹ thuật PCR.

4.4. Thực hiện kỹ thuật PCR:

- Đưa các thành phần cần thiết của phản ứng ra nhiệt độ phòng 10 phút để rã đông hoàn toàn.

- Trộn lẫn các thành phần sau vào một ống 0,2 mL: Buffer, dNTPs, MgCl₂ (nếu trong Buffer chưa có), hỗn hợp mồi (gồm cặp mồi phát hiện virus được trộn theo tỷ lệ nhất định), enzym Taq polymerase, nước khử ion vô trùng, DNA/RNA khuôn.

- Ly tâm nhẹ để các thành phần lắng xuống đáy ống hoàn toàn; Đặt vào máy PCR; Chọn chương trình; Bấm start để máy chạy.

- Điện di sản phẩm PCR (kèm thang chuẩn điện di) và quan sát thông qua hệ thống chụp ảnh.

- Phân tích kết quả:

+ Kết quả từ quá trình PCR được phân tích tùy theo mục đích sử dụng và dựa theo hướng dẫn phân tích của từng bộ kit xét nghiệm.

+ Trong quá trình phân tích kết quả, trước hết cần kiểm tra mẫu chứng. Sau đó, tiến hành phân tích mẫu nếu mẫu chứng đạt yêu cầu.

4.5. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo các quy trình liên quan. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:

+ Thực hiện lấy lại mẫu.

+ Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.

- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng.

+ Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình.

+ Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.

5.2 Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:

+ Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.

+ Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.

- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích.

- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Kiểm tra lại chất lượng DNA/RNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3 Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả.
- + Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
- + Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm;
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
3. Rodríguez R.A., Pepper I.L., Gerba C.P. Application of PCR-Based Methods To Assess the Infectivity of Enteric Viruses in Environmental Samples. ASM Journals Applied and Environmental Microbiology, 75(2).
4. Phạm Hùng Vân, Real-time PCR và PCR - các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp, Nhà xuất bản y học, 2009

21. XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN VIRUS BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm nhằm mục đích xác định sự hiện diện của virus gián tiếp thông qua phát hiện các vật liệu di truyền (DNA hoặc RNA) của virus đó bằng kỹ thuật Real-time PCR.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Real-time PCR (Realtime Polymerase Chain Reaction): là kỹ thuật PCR mà kết quả khuếch đại đoạn DNA đích được hiển thị ngay sau mỗi chu kỳ của phản ứng PCR; chính vì vậy mà được gọi là real-time: thời gian thực và do đặc điểm này mà với kỹ thuật Real-time PCR, người làm xét nghiệm không cần phải làm tiếp các xét nghiệm để đọc các sản phẩm khuếch đại. Khi thực hiện real-time PCR, các thành phần phản ứng sẽ được trộn với nhau trong tube và đặt trong máy real-time PCR để thực hiện quá trình nhân bản DNA. Thành phần phản ứng qPCR bao gồm: mẫu (khuôn DNA/RNA), môi, chất huỳnh quang, đệm, DNA polymerase, nucleotide tự do (dNTP) và các chất hỗ trợ (nếu cần). Hiện nay có hai cách thức để chuẩn bị cho phản ứng qPCR, đó là phối trộn các thành phần đơn lẻ hoặc sử dụng qPCR mix (các thành phần được phối trộn sẵn thành một loại dung dịch).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Ống đựng máu chứa chất chống đông K2/EDTA;
- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;
- Lam kính;
- Lưỡi dao mổ;
- Ống falcon 15mL;

- Ống falcol 50 mL;
- Đầu côn 10 µl có lọc;
- Đầu côn 20 µl có lọc;
- Đầu côn 200 µl có lọc;
- Đầu côn 1mL có lọc;
- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 0,2 mL tiệt trùng;
- Dải ống PCR 0,2 mL;
- Bộ kit tách axit nucleic từ mẫu bệnh phẩm;
- Bộ kit mẫu chứng;
- Bộ kit xét nghiệm phát hiện Virus;
- Cồn chuyên dùng cho sinh học phân tử;
- Nước tinh sạch chuyên dùng cho sinh học phân tử;
- Găng tay không bột chuyên dùng cho sinh học phân tử;
- Giấy không bụi chuyên dùng trong sinh học phân tử;
- Bộ quần áo xét nghiệm.

2.3. Trang thiết bị

- Bể ổn nhiệt;
- Tủ ấm;
- Tủ lạnh;
- Tủ hút hoá chất;
- Pippett các thể tích;
- Máy Real-time PCR;
- Máy ly tâm;
- Tủ an toàn sinh học;
- Bộ pipett kèm giá đỡ;
- khay đựng mẫu.

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô tươi, mẫu mô đã được cố định và vùi nền (FFPE); mẫu máu, mẫu phết cổ tử cung; mẫu dịch cơ thể khác....

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.

- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, kết quả chẩn đoán...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng 6 đến 10 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Xét nghiệm được thực hiện tại Phòng xét nghiệm có đủ năng lực thực hiện xét nghiệm này theo quy định.

3. AN TOÀN

Phải đảm bảo an toàn về các quy định của bệnh viện:

- Quy định về hiệu chỉnh vật tư, trang thiết bị.
- Quy định về an toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Quy định về an toàn hóa chất.
- Quy định về an toàn sinh học.
- Quy định về kiểm soát môi trường, rác thải y tế.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Thực hiện “maintainence” theo hướng dẫn sử dụng

4.1.2. Khởi tạo chương trình chạy máy dựa trên các chương trình có sẵn trên máy

- Mở phần mềm chạy máy đã cài đặt sẵn.
- Chọn chương trình chạy phù hợp.
- Nạp hóa chất và vật tư tiêu hao cần thiết.
- Nạp mẫu chứng lên máy.

4.1.3. Nạp mẫu và chạy máy

- Nạp mẫu bệnh phẩm đã chuẩn bị lên máy.
- Chạy máy theo hướng dẫn.

4.2. Nhận định kết quả

- Kiểm tra chất lượng mẫu đối chứng theo hướng dẫn của bộ kit.
- Đọc và nhận định kết quả.
- + Đọc và ghi nhận kết quả tự động trên máy.
- + Kết luận và bàn luận một số trường hợp đặc biệt.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết và lưu trữ hồ sơ theo “quy trình trả kết quả” và “quy trình lưu trữ hồ sơ”

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn: lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.
- + Thực hiện lấy lại mẫu theo đúng hướng dẫn.
- + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.
- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng.
- + Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình.
- + Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.

5.2. Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.
- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Kiểm tra lại chất lượng DNA/RNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả.
- Kiểm tra lại kết quả và thông tin mẫu bệnh phẩm.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm;
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
3. Phạm Hùng Vân, Real-time PCR và PCR - các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp, Nhà xuất bản y học, 2009.
4. Watzinger F., Ebner K., and Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Mol Aspects Med. 2006 April-June; 27(2): 254-298.

22. XÉT NGHIỆM ĐỊNH LƯỢNG VIRUS BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định số lượng bản sao của virus cụ thể trong mẫu bệnh phẩm như máu, dịch tiết cơ thể; đánh giá mức độ nhiễm virus; theo dõi diễn biến bệnh và hiệu quả điều trị.

1.2. Định nghĩa/ nguyên lý

Nguyên lý cơ bản của kỹ thuật real-time PCR là kỹ thuật sử dụng một cặp mồi đặc hiệu và đầu dò huỳnh quang. Đây là những đầu dò oligonucleotide có trình tự bổ sung với một trình tự đặc hiệu trên gen mục tiêu với đầu 5' có gắn chất phát huỳnh quang (gọi là reporter) và đầu 3' có chất hấp phụ tương ứng (gọi là quencher) để hấp phụ ánh sáng huỳnh quang được phát ra từ reporter. Do đó, khi ở trạng thái nguyên vẹn, mẫu dò không phát được ánh sáng huỳnh quang dù nhận được nguồn sáng kích thích. Khi phản ứng PCR xảy ra, nếu có sự hiện diện của gen mục tiêu, mẫu dò sẽ bắt cặp ở vị trí giữa mồi ngược và mồi xuôi. Hoạt tính 5'→3' exonuclease của DNA polymerase sẽ thủy phân mẫu dò, giải phóng reporter khỏi quencher. Khi đó, reporter sẽ phát huỳnh quang dưới ánh sáng kích thích. Tín hiệu huỳnh quang sẽ được phát hiện tương ứng với sự khuếch đại của gen mục tiêu trong phản ứng PCR.

2 CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Đầu tip 10 µL có lọc;
- Đầu tip 20 µL có lọc;
- Đầu tip 100 µL có lọc;
- Đầu tip 1000 µL có lọc;
- Ống falcon 50 mL;

- Ống đựng mẫu 1,7mL, chuyên dùng cho sinh học phân tử 1,7 mL;
- Ống PCR 0,2 mL (hoặc strip 8 ống dùng cho máy Real-time PCR);
- Ống đựng máu chứa chất chống đông EDTA, ống chứa dịch;
- Ống đựng máu chứa chất chống đông EDTA, ống chứa dịch;
- Block giữ lạnh;
- Giấy không bụi chuyên dùng trong sinh phân tử;
- Găng tay không bột chuyên dùng cho sinh học phân tử;
- Khẩu trang y tế;
- Mũ giấy;
- Pipet nhựa 10 mL;
- Hộp lưu mẫu 81 vị trí;
- Giá nhựa cắm ống 1,5-2mL;
- Giá nhựa cắm ống PCR;
- Cốc đong thủy tinh 250 mL;
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm;
- Kit tách axit nucleic từ mẫu máu, dịch;
- Bộ sinh phẩm định lượng virus;
- Ethanol 100%, chuyên dùng cho sinh học phân tử;
- Cồn sát khuẩn 70°;
- Nước tinh sạch chuyên dùng cho sinh học phân tử.

2.3. Trang thiết bị

- Giá giữ lạnh ống PCR;
- Bộ pipet kèm giá đỡ;
- Thiết bị trợ hút pipet thủy tinh tự động;
- Máy ly tâm lắng mẫu nhanh;
- Máy ly tâm lạnh tách mẫu để bàn;
- Máy lắc rung trộn mẫu;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy định lượng acid nucleic;
- Máy real-time PCR;
- Tủ mát bảo quản mẫu;

- Tủ lạnh sâu -30°C;
- Tủ thao tác PCR;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy tách acid nucleic tự động

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: người bệnh được giải thích về việc lấy mẫu xét nghiệm, phối hợp để lấy mẫu theo đúng yêu cầu. Lấy mẫu theo quy trình.
- Loại mẫu bệnh phẩm: máu toàn phần, dịch cơ thể.
- Dụng cụ chứa mẫu: ống đựng máu chứa EDTA, ống chứa dịch cơ thể.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: 1 ống máu chứa EDTA 2mL.
- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ mẫu bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: cho mẫu vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển mẫu tới phòng xét nghiệm thực hiện trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu xét nghiệm

Kiểm tra phiếu xét nghiệm: Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán...

2.6. Thời gian thực hiện xét nghiệm

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng 8 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN (Nêu các vấn đề an toàn cần lưu ý khi thực hiện kỹ thuật)

- Đảm bảo an toàn cho người thực hiện xét nghiệm, dự phòng nguy cơ trước, trong và sau xét nghiệm.
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- An toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Đảm bảo đầy đủ bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất.
- Đảm bảo an toàn sinh học.
- Đảm bảo các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1 Nhận bệnh phẩm (Kiểm tra thông tin trên mẫu bệnh phẩm với phiếu xét nghiệm, đánh giá mẫu có đủ tiêu chuẩn, xử lý mẫu).

4.2. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất (nếu có).

4.3. Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm

4.4. Thực hiện QC.

4.5. Tiến hành kỹ thuật (Các bước thực hiện kỹ thuật).

Bước 1: Tách acid nucleic

a. Tách bằng cột silica

- Thu mẫu: Để ống đựng máu chứa chất chống đông EDTA hoặc mẫu dịch cơ thể (bảo quản 2-8°C) về nhiệt độ phòng. Lấy mẫu máu hoặc mẫu dịch cơ thể chuyển vào ống ly tâm 1,7mL.

- Ly giải tế bào: Thêm enzym phân hủy protein (proteinase K) và dung dịch đệm phá màng tế bào vào mỗi ống (tránh cho proteinase K và dung dịch đệm phá màng tế bào cùng một lúc với nhau). Ủ 56°C trong 10 phút.

- Cố định acid nucleic lên cột và loại tạp chất: Thêm ethanol 96-100% và trộn đều bằng cách đảo ống 3-5 lần. Chuyển hết dung dịch vào cột lọc và ly tâm 6.000 ×g trong 1 phút, loại dịch và thu cột lọc. Rửa cột bằng cách thêm đệm rửa vào mỗi cột lọc, ly tâm 6000 ×g trong 1 phút, loại dịch. Lặp lại bước rửa cột với đệm rửa. Ly tâm cột lọc ở 16.000-20.000 ×g để làm khô cột.

- Rửa giải cột và thu acid nucleic: Thêm đệm thu acid nucleic vào chính giữa màng cột lọc và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1-5 phút. Ly tâm 8000 ×g để thu acid nucleic lưu trữ.

- Xác định hàm lượng acid nucleic.

b. Tách bằng máy tự động

- Sắp xếp các protocol vào máy theo thứ tự có sẵn

- Đánh số thứ tự mẫu bệnh phẩm, chứng dương, chứng âm vào ống đựng bệnh phẩm và ống đựng acid nucleic trên khay đựng bệnh phẩm của máy tách chiết axit nucleic tự động.

- Sử dụng pipet hút 10µL hóa chất gắn acid nucleic vào các ống đựng bệnh phẩm.

- Sử dụng pipet hút 200 μ L bệnh phẩm, chúng dương, chúng âm vào các ống đựng bệnh phẩm theo số thứ tự.
- Đặt khay đựng mẫu bệnh phẩm vào máy tách chiết acid nucleic tự động.
- Sử dụng đầu đọc mã code để nhập protocol barcode, thẻ tích mẫu, loại ống thu mẫu và thẻ tích thu mẫu vào máy.
- Ấn nút Enter trên màn hình để máy bắt đầu tách chiết acid nucleic.
- Sau khi máy tách chiết acid nucleic chạy xong, lấy acid nucleic ra khỏi máy, loại bỏ các protocol và bật tia UV để khử trùng máy.
- Acid nucleic sau khi được tách chiết phải bảo quản ở tủ -20°C / -80°C .

c. Tách bằng hạt từ

- Thu mẫu: Để ống đựng máu chứa chất chống đông EDTA hoặc mẫu dịch cơ thể (bảo quản $2-8^{\circ}\text{C}$) về nhiệt độ phòng. Lấy mẫu máu hoặc mẫu dịch cơ thể chuyển vào ống ly tâm 1,7mL.
- Ly giải tế bào: Thêm enzym phân hủy protein (proteinase K) và dung dịch đệm phá màng tế bào vào mỗi ống (tránh cho proteinase K và dung dịch đệm phá màng tế bào cùng một lúc với nhau). Ủ 56°C trong 10 phút.
- Gắn acid nucleic vào hạt từ : Thêm dung dịch đệm gắn kết với, ethanol 96-100% và beads từ vào ống chứa dung dịch ly giải tế bào, trộn đều và ủ khoảng 30 phút ở nhiệt độ phòng.
- Loại bỏ tạp chất: Đặt ống lên giá từ ở nhiệt độ phòng cho đến khi dung dịch chứa hạt từ trong hoàn toàn, hút bỏ dịch trong mà không chạm vào hạt từ. Rửa hạt từ bằng cách thêm dung dịch rửa và đặt lại ống lên giá từ và loại bỏ dịch trong, giữ lại hạt từ. Lặp lại bước rửa thêm 2 lần với đệm rửa.
- Thu hồi acid nucleic: thêm dung dịch đệm thu acid nucleic vào ống chứa hạt từ đã được rửa với đệm rửa, trộn đều và ủ khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó đặt ống lên giá từ cho đến khi dung dịch trong lại. Thu dung dịch nổi trong vào ống thu acid nucleic và lưu trữ ở nhiệt độ -20°C / -80°C .
- Xác định hàm lượng acid nucleic.

Bước 2: Khuếch đại và phát hiện đoạn gen quan tâm

Chuẩn bị phản ứng:

- Ghi tên các ống theo thứ tự.

- Mẫu acid nucleic + master mix theo nồng độ khuyến cáo (nếu sử dụng kit định lượng chế tạo sẵn).

- Chuyển ống vào máy PCR và chạy chương trình theo hướng dẫn nhà sản xuất.

Bước 3. Nhận định kết quả

- Sau khi kết thúc chương trình chạy, tất cả các kết quả được hiển thị lên màn hình.

- Kiểm tra các đường chuẩn và mẫu đối chứng âm trước.

+ Nếu đạt yêu cầu (theo hướng dẫn của kit sử dụng hoặc theo kết quả lý thuyết đã tối ưu) thì tiếp tục phân tích các mẫu khác theo kết quả thu được.

+ Nếu không đạt yêu cầu (mẫu chuẩn không có tín hiệu huỳnh quang, mẫu đối chứng âm bị nhiễm thành dương tính...) thì không đủ cơ sở để phân tích các mẫu khác. Trong trường hợp này phải lặp lại xét nghiệm sau khi đã tìm ra nguyên nhân sai sót ở xét nghiệm trước.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót/ Nguyên nhân gây sai lệch kết quả	Xử trí
Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông	Thực hiện theo đúng hướng dẫn quy cách lấy mẫu.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sai sót/ Nguyên nhân gây sai lệch kết quả	Xử trí
Thao tác pipet không chính xác	Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
Tín hiệu phản ứng không rõ	Bảo quản hóa chất theo đúng khuyến cáo của nhà sản xuất. Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót/ Nguyên nhân gây sai lệch kết quả	Xử trí
Nhầm lẫn kết quả khi phân tích	Người phân tích kết quả kiểm tra kỹ thông tin mẫu.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).
- Bảo dưỡng máy định kỳ hàng ngày, hàng tuần và hàng tháng theo quy định.
- Hóa chất, vật tư trước khi đưa vào sử dụng cần được kiểm tra/đánh giá theo quy định, đảm bảo chất lượng và đủ cơ số hóa chất, vật tư để thực hiện xét nghiệm.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ y tế, Hướng dẫn quy trình kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh chuyên ngành huyết học - Truyền máu miễn dịch - Di truyền - Sinh học phân tử, Nhà xuất bản y học, Hà Nội, 2014.
2. Phạm Hùng Vân, Real-time PCR và PCR - các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp, Nhà xuất bản y học, 2009.
3. Trường đại học y Hà Nội, Bài giảng y sinh học phân tử, Nhà xuất bản Y học, 2023.
4. Đỗ Trung Phấn, Kỹ thuật xét nghiệm huyết học và truyền máu ứng dụng trong lâm sàng, Nhà xuất bản y học, 2016.
5. Sprygin Alexander et al, A real-time PCR screening assay for the universal detection of lumpy skin disease virus DNA, BMC Research Notes volume, 2019.

23. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH HLA (MỘT TRONG SỐ CÁC LOCUS: A, B, C, DR, DQ HOẶC DP) BẰNG KỸ THUẬT PCR-SSO

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích

Xác định nhóm HLA trên bề mặt bạch cầu của người cho và người nhận ở độ phân giải cao để đánh giá mức độ hòa hợp mô, phục vụ cho ghép tế bào gốc và ghép các cơ quan.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên nguyên lý lai giữa đầu dò DNA với sản phẩm DNA của mẫu xét nghiệm đánh dấu bằng huỳnh quang, trong đó các đầu dò DNA được thiết kế đặc hiệu cho từng alen HLA ở độ phân giải cao (High resolution). Tùy theo mật độ huỳnh quang tương ứng, hệ thống Luminex hoặc hệ thống máy tương thích đọc và xác định được tên đầu dò đã gắn với chuỗi DNA của mẫu và kiểu gen HLA tương ứng.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.1.1. Hóa chất

- Hóa chất PCR SSO:
 - + Môi DNA (primer) đặc hiệu HLA;
 - + Đệm PCR;
 - + Probe lai DNA chứa hạt nhựa gắn đầu dò (probe) đặc hiệu DNA đối với từng alen HLA;
 - + Dung dịch đệm lai, đệm hồi tính, đệm biến tính, đệm rửa;
 - + Taq polymerase.
- Hóa chất tách DNA;
- Dung dịch hóa chất huỳnh quang;
- Hóa chất chuẩn máy;

- Dung dịch sheath chạy máy;
- Dung dịch Ficoll;
- Cồn tuyệt đối;
- Isopropanol;
- Cồn 70°;
- Nước khử ion;
- Nước cất;
- Hoá chất khử trùng;
- Mẫu ngoại kiểm.

2.1.2. Vật tư

- Bộ micropipet các loại;
- Pipet đa kênh;
- Đầu côn có màng lọc các loại;
- Ống ly tâm đáy nhọn 1,5mL;
- Strip 8 ống PCR 0,2mL;
- Ống fancel 15mL, 50mL;
- Phiến nhựa 96 giếng 0,2mL;
- Khay nhựa đựng ống ly tâm đáy nhọn;
- Khay giữ lạnh chứa ống ly tâm đáy nhọn;
- Giấy dán phiến;
- Pipet nhựa;
- Ống nhựa 5mL vô trùng;
- Giấy thấm cho máy đo DNA;
- Ống nhựa chứa chất chống đông EDTA, Citrate;
- Găng tay, mũ, khẩu trang, túi đựng rác.

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Máy ủ nhiệt;
- Hệ thống Luminex hoặc hệ thống máy tương thích cho xét nghiệm này.
- Máy ly tâm lạnh;
- Máy trộn mẫu vortex;

- Máy tính và phần mềm kết nối với hệ thống Luminex hoặc hệ thống máy tương thích.

- Tủ an toàn sinh học;
- Bể ổn nhiệt;
- Tủ lạnh bảo quản mẫu;
- Tủ lạnh bảo quản sinh phẩm hóa chất;
- Máy đo DNA.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Mẫu DNA đã tách sẵn hoặc bệnh phẩm máu ngoại vi, máu dây rốn, dịch tủy xương, dịch ối, gai rau hoặc các bệnh phẩm phù hợp khác.

+ Với các mẫu bệnh phẩm máu ngoại vi, máu dây rốn, dịch tủy xương, dịch ối, gai rau, cần tách DNA trước bằng hóa chất tách DNA;

+ Với các mẫu DNA đã tách sẵn, cần đảm bảo yêu cầu về nồng độ tối thiểu 10 ng/ μ L, độ tinh sạch 1,6 - 2,2.

- Kiểm tra lại nồng độ DNA của mẫu trước khi xét nghiệm;

2.5. Hồ sơ

Yêu cầu phiếu chỉ định kỹ thuật có đầy đủ thông tin theo quy định của đơn vị.

2.6. Thời gian thực hiện xét nghiệm: 5 giờ

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

3.1 An toàn thực hành

- Mặc áo bảo hộ khi làm việc;
- Đeo găng tay trong tất cả quá trình tiếp xúc trực tiếp với mẫu máu, hóa chất;
- Đi giày, dép kín mũi chân;
- Thao tác đúng quy trình, chính xác.

3.2 An toàn hóa chất

- Ghi rõ ngày nhận, mở hóa chất;
- Hóa chất chưa sử dụng được sắp xếp gọn gàng, phân loại rõ ràng;
- Đọc kỹ nhãn mác hóa chất trước khi sử dụng;
- Hóa chất thải bỏ được đổ, để đúng nơi quy định.

3.3 An toàn thiết bị và điện

- Đảm bảo tay và các bề mặt làm việc khô trước khi chạm vào thiết bị điện hay dây nối;
- Kiểm tra mọi dây dẫn phích và dây nối dài, tìm các dấu hiệu tróc lớp cách điện. Thay thế nếu cần;
- Không tự ý cắt đóng cầu dao điện;
- Luôn có đường điện ưu tiên để an toàn cho các thiết bị.

3.4. Quy định về hiệu chuẩn

Các thiết bị được hiệu chuẩn theo quy định để đảm bảo quá trình vận hành cho xét nghiệm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Khuếch đại mẫu DNA sau tách

- Đưa đệm PCR và DNA mẫu về nhiệt độ phòng. Vortex ống đệm 1 phút, ly tâm bằng máy spin down 3 giây;
- Chuẩn bị DNA mẫu, nên để nồng độ từ 10 đến 50 ng/ μ L. Mẫu có nồng độ trên 50 ng/ μ L có thể pha loãng bằng nước vô trùng. Đối với hàng giếng đầu của mỗi locus là giếng chứng âm, DNA sẽ được thay bằng nước cất;
- Khởi động máy PCR, chờ máy làm ấm;
- Lấy strip có nắp dành cho PCR, ghi tên mẫu, tên locus vào strip, chia DNA pha loãng vào mỗi giếng PCR;
- Chuẩn bị dung dịch đệm PCR với thành phần cho mỗi locus của một mẫu. Chia dung dịch đệm vào mỗi giếng PCR, đậy nắp, ký hiệu trên nắp ống để tránh nhầm lẫn;
- Chuyển strip vào máy PCR, đậy máy. Chọn chương trình phản ứng PCR;
- Chờ máy chạy xong thu được sản phẩm PCR, có thể lưu trong nhiệt độ lạnh 4-8°C trước khi sử dụng.

4.1.2. Lai sản phẩm DNA đã khuếch đại với hạt probe đặc hiệu

- Ủ hạt bead gắn đầu dò ở 55-60°C trong 5-10 phút;
- Tiếp tục vortex ống đựng hạt bead trong 1 phút. Chia hạt bead vào từng giếng trên phiến nhựa 96 giếng (tránh ánh sáng);

- Thêm sản phẩm PCR vào đúng vị trí, đậy kín phiến bằng miếng dán;
- Chuyển phiến vào máy PCR, đậy nắp nhựa, chạy chương trình lại;
- Pha loãng hóa chất huỳnh quang để cho vào mỗi giếng;
- Khi quá trình lai kết thúc, thêm hóa chất huỳnh quang vào mỗi giếng;
- Chuyển phiến nhựa vào máy Luminex, chạy máy.

4.2. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả đã xuất đạt yêu cầu bao gồm:
 - + Giếng chứng âm không có tín hiệu huỳnh quang trên phần mềm phân tích;
 - + Các hạt mang DNA mẫu có tín hiệu huỳnh quang;
 - + Các hạt chứng dương trong giếng có mẫu đều cho tín hiệu phù hợp;
- Kết quả HLA được phân tích và được hiển thị phù hợp.
- + Kết quả HLA là 2 chữ số đứng ngay sau các chữ cái biểu thị tên của locus và 2 chữ số sau dấu hai chấm (VD A*01:01, B*15:02).
- + Mỗi locus có 2 allele, nằm trên 2 nhiễm sắc thể, vì vậy cần ghi đủ kết quả 2 allele (VD A*01:01 - A*33:03).
- Nếu có vấn đề bất thường sau cần tiến hành thực hiện lại quy trình xét nghiệm từ bước PCR:
 - + Giếng chứng âm có tín hiệu bất thường với tất cả các locus của mẫu;
 - + Mẫu xét nghiệm không hiện kết quả với tất cả các locus của mẫu.
- Nếu có vấn đề bất thường sau cần tiến hành thực hiện lại quy trình xét nghiệm từ bước lai:
 - + Giếng chứng âm có tín hiệu bất thường với một vài locus của mẫu;
 - + Mẫu xét nghiệm không hiện kết quả với một vài locus của mẫu.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Nhập kết quả từ bản báo cáo của máy;
- In kết quả;
- Lãnh đạo khoa hoặc cán bộ được phân công duyệt kết quả.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

ST T	Nguyên nhân	Cụ thể	Cách nhận biết	Biện pháp khắc phục
1	Hành chính	Nhầm mẫu, nhầm tên	Đối chiếu thông tin mẫu và chỉ định	Sửa thông tin
2	Chất lượng mẫu	DNA mẫu không tinh sạch	- Chỉ số A260/280 không nằm trong giới hạn cho phép - Khu vực làm việc không được vệ sinh, lây nhiễm chéo bệnh phẩm hoặc các chất tiết	- Vệ sinh lại khu vực tách mẫu. - Tách lại mẫu.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

ST T	Nguyên nhân	Cụ thể	Cách nhận biết	Biện pháp khắc phục
1	Trang thiết bị, dụng cụ	Máy PCR bị lỗi	Tất cả các giếng không có tín hiệu	Làm lại PCR
		Lỗi pipet và đầu côn	Hút mẫu không lên	Sửa/thay pipet, đầu côn
2	Hóa chất, sinh phẩm	Lỗi kit do quá hạn, lỗi bảo quản, do nhiễm bẩn	Khi xét nghiệm có một locus tín hiệu bất thường còn các locus khác bình thường	Làm lại với kit mới
		Lỗi Taq polymerase	Tất cả các giếng không lên tín hiệu	Đổi Taq, làm lại
		Lỗi SA-PE	Không lên tín hiệu khi lai	Lai lại

ST T	Nguyên nhân	Cụ thể	Cách nhận biết	Biện pháp khắc phục
3	Nhân viên xét nghiệm	Thao tác không tốt ở bước PCR	Không lên tín hiệu ở tất cả các giếng	Làm lại bước PCR
		Thao tác không tốt ở bước lai	Không lên tín hiệu ở một số giếng	Làm lại bước lai

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

ST T	Nguyên nhân	Cụ thể	Cách nhận biết	Biện pháp khắc phục
1	Phân tích kết quả	Chọn sai vị trí probe trên phần mềm	Không lên kết quả	Chọn lại chính xác probe
		Chọn nhầm lot trên phần mềm	Không lên kết quả	Chọn lot đúng

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Kết quả nội kiểm đạt yêu cầu.
- Kết quả ngoại kiểm phù hợp với tổ chức ngoại kiểm (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Heather Dunckley (2012). HLA typing by SSO and SSP methods. *Immunogenetics-Method in Molecular Biology*, Volume 882, p 9-25.
2. Luminex (2008). Luminex 200 system user manual.
3. Immucor (2013). HLA-SSO typing kits (*for In vitro diagnostic use*). www.immuncor.com, p1-10.

24. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH HLA (MỘT TRONG SỐ CÁC LOCUS: A, B, C, DR, DQ HOẶC DP) BẰNG KỸ THUẬT PCR-SSP

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích

Xác định nhóm HLA trên bề mặt bạch cầu của người cho và người nhận để đánh giá mức độ hòa hợp mô, phục vụ cho ghép tế bào gốc và ghép các cơ quan.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Dựa trên nguyên lý nhân bản chuỗi gen bằng cặp mồi đặc hiệu (sử dụng kỹ thuật PCR) để xác định các locus HLA tương ứng;

- DNA được trộn với mồi đặc hiệu (primer) có trong các giếng của phiên kit, khi chạy trên máy PCR sẽ nhân bản đoạn gen mã hóa HLA. Dem điện di sản phẩm sau khi chạy PCR, soi dưới đèn chuyên dụng sẽ phát hiện các vị trí có băng dương tính, tương ứng với kiểu gen HLA của mẫu xét nghiệm.

- Dựa trên các vị trí có băng dương tính, nhập thông số vào phần mềm phân tích, phần mềm sẽ đưa ra tên kháng nguyên HLA của mẫu xét nghiệm.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Hóa chất

- Hóa chất PCR HLA-SSP:
 - + Phiên kit;
 - + Dung dịch đệm chạy mẫu;
 - + Giấy dán phiên.
- Hóa chất tách DNA;
- Taq polymerase;
- Thạch Agarose;
- Hóa chất nhuộm gel;
- Đệm TBE;

- Dung dịch Ficoll;
- Cồn tuyệt đối;
- Cồn 70°;
- Isopropanol;
- Nước khử ion;
- Nước cất;
- Mẫu ngoại kiểm;

2.1.2. Vật tư

- Bộ micropipet các loại;
- Pipet đa kênh;
- Đầu côn có màng lọc các loại;
- Ống ly tâm đáy nhọn 1,5 mL;
- Ống 5mL có nắp vô trùng;
- Ống Fancol 15mL, 50mL;
- Khay nhựa đựng ống ly tâm đáy nhọn;
- Khay giữ lạnh chứa ống ly tâm đáy nhọn;
- Khay giữ lạnh chứa phiên kit;
- Lọ thủy tinh 250mL;
- Pipet nhựa;
- Ống nhựa 5mL vô trùng;
- Giấy thấm cho máy đo DNA;
- Ống nhựa chứa chất chống đông EDTA, Citrate;
- Găng tay, mũ, khẩu trang, túi đựng rác.

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Máy ly tâm lạnh;
- Máy trộn mẫu vortex;
- Bộ dụng cụ điện di bao gồm: khuôn đổ gel, bể điện di, nguồn điện di, lò vi sóng để pha gel,
- Thiết bị đọc kết quả: máy chụp ảnh gel, bàn soi gel; máy tính và phần mềm phân tích kết quả.

- Tủ an toàn sinh học;
- Bể ôn nhiệt;
- Tủ lạnh bảo quản mẫu;
- Tủ lạnh bảo quản sinh phẩm hóa chất;
- Máy đo DNA.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Mẫu DNA đã tách sẵn hoặc bệnh phẩm máu ngoại vi, máu dây rốn, dịch tủy xương, dịch ối, gai rau hoặc các bệnh phẩm phù hợp khác.
 - + Với các mẫu bệnh phẩm máu ngoại vi, máu dây rốn, dịch tủy xương, dịch ối, gai rau, cần tách DNA trước bằng hóa chất tách DNA.
 - + Với các mẫu DNA đã tách sẵn, cần đảm bảo yêu cầu về nồng độ tối thiểu 10 ng/ μ L, độ tinh sạch 1,6 - 2,2.
- Kiểm tra lại nồng độ DNA của mẫu trước khi xét nghiệm;

2.5. Hồ sơ

Yêu cầu phiếu chỉ định kỹ thuật có đầy đủ thông tin theo quy định của đơn vị.

2.6. Thời gian thực hiện xét nghiệm: 5 giờ

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

3.1 An toàn thực hành

- Mặc áo bảo hộ khi làm việc;
- Đeo găng tay trong tất cả quá trình tiếp xúc trực tiếp với mẫu máu, hóa chất;
- Đi giày, dép kín mũi chân;
- Thao tác đúng quy trình, chính xác.

3.2 An toàn hóa chất

- Ghi rõ ngày nhận, mở hóa chất;
- Hóa chất chưa sử dụng được sắp xếp gọn gàng, phân loại rõ ràng;
- Đọc kỹ nhãn mác hóa chất trước khi sử dụng;
- Hóa chất thải bỏ được đổ, để đúng nơi quy định.

3.3 An toàn thiết bị và điện

- Đảm bảo tay và các bề mặt làm việc khô trước khi chạm vào thiết bị điện hay dây nối;

- Kiểm tra mọi dây dẫn phích và dây nối dài, tìm các dấu hiệu tróc lớp cách điện. Thay thế nếu cần;

- Không tự ý cắt đóng cầu dao điện;

- Luôn có đường điện ưu tiên để an toàn cho các thiết bị.

3.4. Quy định về hiệu chuẩn

Các thiết bị được hiệu chuẩn theo quy định để đảm bảo quá trình vận hành cho xét nghiệm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Khuếch đại mẫu DNA sau tách

- Chuẩn bị phiên PCR;
 - Khởi động máy PCR;
 - Rã đông DNA và đệm PCR ở nhiệt độ phòng.
 - Trộn đều đệm PCR, DNA và Taq polymerase theo tỷ lệ của hướng dẫn từ hãng;

- Chia 11-13 μ L hỗn hợp trên vào mỗi giếng trong phiên kit;
 - Dùng giấy dán đầy kín mặt phiên, ghi thông tin mẫu;
 - Chọn chương trình chạy tương ứng với từng kit đã cài đặt trên máy PCR;
 - Chuyển phiên kit vào máy, chạy máy theo chương trình đã chọn;
 - Chờ máy chạy xong thu được sản phẩm PCR, có thể lưu trong nhiệt độ lạnh 4-8°C trước khi sử dụng.

4.1.2. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị khay đổ gel; cho bột gel Agarose vào lọ thủy tinh, pha đệm TBE với tỷ lệ tương ứng;

- Dùng lò vi sóng để hòa tan gel;

- Thêm hóa chất nhuộm DNA, lắc đều tay;

- Đổ gel lên khuôn, chờ gel khô;

- Lấy phiên kit ra khỏi máy PCR, gỡ bỏ giấy dán nhẹ nhàng;

- Đặt gel vào bể điện di, đổ ngập gel bằng đệm TBE;

- Dùng pipet đa kênh, hút 11-13 μ L sản phẩm PCR từ phiên kit tra vào giếng trên gel, thao tác chính xác, tránh hút nhầm;
- Dùng dây nối các điện cực của bể điện di với nguồn điện di, thiết lập các thông số hiệu điện thế và thời gian;
- Chạy điện di;
- Sau khi điện di xong, chuyển bản gel sang bàn soi gel;
- Bật đèn, dùng máy ảnh hoặc thiết bị tương đương ghi lại hình ảnh các băng trên gel;
- Lưu hình ảnh trên máy tính;
- Mở phần mềm phân tích, lựa chọn vị trí các băng dương tính và phân tích kết quả.

4.2. Nhận định kết quả

- Kết quả được đánh giá đạt yêu cầu khi:
 - + Băng điện di bao gồm băng chứng, băng dương tính rõ ràng, không nhòe, không mờ hoặc mất.
 - + Phần mềm phân tích ra được kết quả khi nhập đúng vị trí của băng điện di.
 - Băng dương tính trên gel là băng xuất hiện giữa băng chứng và môi.
 - Kết quả HLA là 2 chữ số đứng ngay sau các chữ cái biểu thị tên của locus (VD A*01, B*15).
 - Mỗi locus có 2 allele, nằm trên 2 nhiễm sắc thể, vì vậy cần ghi đủ kết quả 2 allele (VD A*01 - A*33).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Nhập kết quả từ bản báo cáo của máy;
- In kết quả;
- Lãnh đạo khoa hoặc cán bộ được phân công duyệt kết quả.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

ST T	Nguyên nhân	Cụ thể	Cách nhận biết	Biện pháp khắc phục
1	Hành chính	Nhầm mẫu, nhầm tên	Đối chiếu thông tin mẫu và chỉ định	Sửa thông tin
2	Chất lượng mẫu	DNA mẫu không tinh sạch	Chỉ số A260/280 không nằm trong giới hạn cho phép Khu vực làm việc không được vệ sinh, lây nhiễm chéo bệnh phẩm hoặc các chất tiết	Vệ sinh lại khu vực tách Tách lại mẫu

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

ST T	Nguyên nhân	Cụ thể	Cách nhận biết	Biện pháp khắc phục
1	Trang thiết bị, dụng cụ	Máy PCR bị lỗi	Tất cả các giếng không có tín hiệu	Làm lại PCR
		Máy điện di lỗi nguồn, điện cực	Không thấy dấu hiệu điện vào, điện di không lên vạch.	Sửa nguồn điện di
		Lỗi pipet và đầu côn	Hút mẫu không lên	Sửa/thay pipet, đầu côn
2	Hóa chất, sinh phẩm	Lỗi kit, lỗi Taq hoặc đệm	Kit bảo quản không tốt, bị hở khi lấy mẫu để làm, nhiệt độ bảo quản không đúng. Không lên vạch bình thường hoặc không có vạch khi điện di.	Làm lại với kit mới
3	Nhân viên xét nghiệm	Thao tác không tốt ở bước PCR	Thể tích mẫu trong các giếng bị hụt, khi điện di	Làm lại bước PCR

ST T	Nguyên nhân	Cụ thể	Cách nhận biết	Biện pháp khắc phục
			không lên vạch, đặc biệt các giếng sát rìa	
		Làm gel không tốt	Gel bị mỏng, dàn không đều, khó nhỏ mẫu	Làm gel mới

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

STT	Nguyên nhân	Cụ thể	Cách nhận biết	Biện pháp khắc phục
1	Phân tích kết quả	Chọn nhầm giếng trên phần mềm	Không lên kết quả	Chọn lại chính xác theo giếng
		Chọn nhầm version phân tích trên phần mềm	Không lên kết quả	Chọn version phân tích đúng

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Kết quả nội kiểm đạt yêu cầu.
- Kết quả ngoại kiểm phù hợp với tổ chức ngoại kiểm (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Texas Biogene (2013). Morgan HLA ABDR SSP typing kit. Instruction for use.
2. Texas Biogene (2013). Morgan HLA C SSP typing kit. Instruction for use.
3. Texas Biogene (2013). Morgan HLA DQB SSP typing kit. Instruction for use.
4. Bộ Y tế (2013). Xét nghiệm định typ HLA bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh chuyên ngành Huyết học - Truyền máu, Miễn dịch-Di truyền, trang 150-151.

25. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH HLA ĐỘ PHÂN GIẢI CAO BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các locus HLA ở độ phân giải cao bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới NGS (Next-Generation Sequencing).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Xét nghiệm HLA là một kỹ thuật cao thường được sử dụng để đánh giá mức độ phù hợp kháng nguyên bạch cầu giữa người hiến và người nhận trong ghép tế bào gốc, ghép tạng.

- Mức độ tương đồng HLA (class I và class II) đóng vai trò quan trọng trong ghép tế bào gốc. HLA class I bao gồm các locus HLA-A, HLA-B, HLA-C; HLA class II bao gồm các locus HLA-DRB1, HLA-DQA1/ DQB1 và HLA-DPB1.

- Sử dụng kỹ thuật NGS phân tích trình tự các vùng gen mã hóa các locus HLA cho phép xét nghiệm định typ tất cả các locus HLA ở độ phân giải cao, có giá trị lớn đối với ghép tế bào gốc, đặc biệt là ghép tế bào gốc tạo máu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư, sinh phẩm

Vật tư, sinh phẩm thiết yếu	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit chuẩn bị mẫu thư viện HLA	
Kit giải trình tự gen	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube;

- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 µL;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Máy PCR;
- Máy giải trình tự gen và thiết bị đi kèm.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm.

- Bệnh phẩm là máu ngoại vi, dịch hút tủy xương, chống đông (ống EDTA K2/K3).
- Mẫu máu ổn định khi lưu trữ ở nhiệt độ phòng trong 24h hoặc 1 tuần ở điều kiện 2-8°C.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm.

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật.

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 48-72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật.

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

- Tách chiết DNA tổng số sử dụng bộ sinh phẩm và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu DNA có thể lưu ở 2-8°C trong 24h và lưu trữ lâu hơn ở -20 °C.

4.1.2. Thực hiện phản ứng Long Ranged PCR

- Khuếch đại các vùng gen đích mã hóa các locus HLA bằng kỹ thuật Long Ranged PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

- Chuẩn bị master mix và chạy PCR theo hướng dẫn quy trình của nhà sản xuất.

4.1.3. Giải trình tự gen

- Gắn index bằng phản ứng PCR theo quy trình của nhà sản xuất;

- Tinh sạch thư viện DNA sử dụng hạt từ;

- Khuếch đại thư viện DNA bằng phản ứng PCR;

- Tinh sạch lần 2;

- Đánh giá chất lượng và đo nồng độ thư viện bằng hệ thống định lượng huỳnh quang Qubit hoặc phương pháp, thiết bị tương đương, ví dụ NanoDrop.....

- Biến tính, pha loãng thư viện DNA;

- Chuẩn bị cartridge hóa chất;

- Nạp mẫu thư viện;

- Giải trình tự trên máy NGS.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

- Đánh giá kết quả chạy dựa trên các thông số chạy NGS, như mật độ cluster, độ phủ (coverage),...

- Xuất kết quả từ máy NGS và thực hiện phân tích trên phần mềm tin sinh học (MiSeq reporter, CLC Genomic Workbench, IGV,...).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cornaby C, Schmitz JL, Weimer ET. Next-generation sequencing and clinical histocompatibility testing. Hum Immunol. 2021 Nov;82(11):829-837.
2. Danzer, M., Niklas, N., Stabentheiner, S. et al. Rapid, scalable and highly automated HLA genotyping using next-generation sequencing: a transition from research to diagnostics. BMC Genomics 14, 221 (2013).
3. Profaizer T, Pole A, Monds C, Delgado JC, Lázár-Molnár E. Clinical utility of next generation sequencing based HLA typing for disease association and pharmacogenetic testing. Hum Immunol. 2020 Jul;81(7):354-360.

26. XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH HLA ĐỘ PHÂN GIẢI CAO BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN SANGER.

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các locus HLA ở độ phân giải cao bằng kỹ thuật giải trình tự gen dựa trên nguyên lý Sanger.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Xét nghiệm HLA là một kỹ thuật cao thường được sử dụng để đánh giá mức độ phù hợp kháng nguyên bạch cầu giữa người hiến và người nhận trong ghép tế bào gốc, ghép tạng.

- Mức độ tương đồng HLA (class I và class II) đóng vai trò quan trọng trong ghép tế bào gốc. HLA class I bao gồm các locus HLA-A, HLA-B, HLA-C; HLA class II bao gồm các locus HLA-DRB1, HLA-DQA1/ DQB1 và HLA-DPB1.

- Sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger phân tích trình tự các vùng gen mã hóa các locus HLA cho phép xét nghiệm định typ tất cả các locus HLA ở độ phân giải cao, có giá trị lớn đối với ghép tế bào gốc, đặc biệt là ghép tế bào gốc tạo máu.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư sinh phẩm

Vật tư, sinh phẩm thiết yếu	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit chuẩn bị mẫu thư viện HLA	
Kit giải trình tự gen	
Vật tư, sinh phẩm phụ trợ khác	

2.3. Trang thiết bị

2.3.1. Trang thiết bị trực tiếp

- Tủ an toàn sinh học cấp II;

- Máy ly tâm ống máu thể tích 10mL (EDTA/ Streck tube);
- Máy ly tâm lạnh cho ống 2mL/1,5mL (2-8 °C);
- Máy vortex, máy spindown;
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu (-20°C đến -80°C);
- Giá từ loại 0,2 mL và 1,5mL;
- Pipet các loại 2, 10, 100, 200, 1000 µL;
- Đồng hồ hẹn giờ;
- Máy PCR;
- Máy giải trình tự gen Sanger và thiết bị đi kèm.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm là máu ngoại vi, dịch hút tủy xương, chống đông (ống EDTA K2/K3).
- Mẫu máu ổn định khi lưu trữ ở nhiệt độ phòng trong 24h hoặc 1 tuần ở điều kiện 2-8°C.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 48-72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.
- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

- Tách chiết DNA tổng số sử dụng bộ sinh phẩm và theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu DNA có thể lưu ở 2-8°C trong 24h và lưu trữ lâu hơn ở -20 °C.

4.1.2. Thực hiện phản ứng Long Ranged PCR

- Khuếch đại các vùng gen đích mã hóa các locus HLA bằng kỹ thuật Long Ranged PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

- Chuẩn bị master mix và chạy PCR theo hướng dẫn quy trình của nhà sản xuất.

4.1.3. Giải trình tự gen

- Sử dụng kit giải trình tự gen sanger theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Sử dụng môi giải trình tự gen HLA theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Giải trình tự trên máy Sanger sequencing.

4.2. Phân tích và nhận định kết quả

Đánh giá kết quả chạy dựa trên các thông số giải trình tự gen

Xuất kết quả từ máy và thực hiện phân tích trên phần mềm tin sinh học (ví dụ: Assign, Conexio Genomics.....).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kiểm soát các mẫu chứng (hoặc IC) theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dunn, P. P. J. (2011). Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal. International Journal of Immunogenetics.
2. Transplantation Immunology, Methods and Protocols, Humana Press 2019.
3. Voorter, C. E. et al. (2018). Full-length hemizygous SBT reveals novel HLA-A, B, C alleles. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics.

27. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ MỘC MẢNH GHÉP (CHIMERISM) VỚI MÁU TOÀN PHẦN BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định % tế bào người cho ở người bệnh sau ghép để điều chỉnh thuốc ức chế miễn dịch, đánh giá tình trạng mọc mảnh ghép và nguy cơ thải ghép cho người bệnh điều trị bằng phương pháp ghép tế bào gốc.

1.2. Nguyên lý

- Trong ghép tế bào gốc tạo máu đồng loài, mục tiêu chính của việc đánh giá tình trạng mọc mảnh ghép là giúp tiên lượng các biến chứng sau ghép như thải ghép, bệnh ghép chống chủ nhằm can thiệp bằng cách điều chỉnh, sử dụng các phác đồ điều trị hợp lý.

- Ở mức độ phân tử, nguyên lý cơ bản của phân tích mọc mảnh ghép là xác định sự khác biệt về hệ gen giữa người cho và người nhận. Một phần khác biệt rất nhỏ của hệ gen có thể được dùng làm chỉ thị phân tử để phân biệt hai cá thể khác nhau như STR, VNTR, indel.

- Phương pháp Real-time PCR định lượng tế bào người cho ở người nhận sau ghép dựa trên chỉ số Cq là thời điểm đường biểu diễn khuếch đại vượt qua đường huỳnh quang nền của các chỉ thị phân tử khác biệt giữa người cho và người nhận.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Kit định danh cá thể	

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy real-time PCR;

- Máy tính có phần mềm phân tích dữ liệu;
- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Tủ lạnh 2°C - 8 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 µL đến 1000 µL.
- Phần mềm quản lý xét nghiệm.
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-12 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.
- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.2 Tách chiết DNA từ máu toàn phần

Tách chiết DNA bằng cột silica-gel hoặc bằng hạt từ trên máy tách tự động. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Đo nồng độ DNA

Đo nồng độ và đánh giá độ tinh sạch của DNA ở bước sóng 260nm và 280nm, hoặc sử dụng chất chỉ thị màu gắn DNA đối với máy đo huỳnh quang.

4.1.4. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng real-time PCR đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1 - 2 giây.

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng real-time PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bổ sung DNA/RNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA/RNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).

- Đặt các ống phản ứng vào máy real-time PCR, chọn chương trình tương thích.

- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.

- Kết thúc quá trình PCR, lưu dữ liệu và loại bỏ ống phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Kết quả xác định chỉ thị phân tử khác biệt giữa người cho và người nhận trước ghép tế bào gốc tạo máu và kết quả định lượng tế bào người cho ở người nhận sau ghép tế bào gốc tạo máu được tính toán trên phần mềm chuyên dụng, thực hiện theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Thao tác pipet không chính xác.	▪ Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
▪ Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.	▪ Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất ▪ Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kết quả được chấp nhận khi:

- Chứng dương có đường khuếch đại với Ct như khuyến cáo của kit sử dụng;
- Chứng H₂O không xuất hiện đường khuếch đại;
- Độ lặp lại của các mẫu tương đương nhau.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bader P, Holle W, Klingebiel T, et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. Bone Marrow Transplant. 1997;19:697-702.

2. Barrios M, Jimenez-Velasco A, Roman-Gomez J, et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. Haematologica. 2003;88:801-810.

3. Lamba R, Abella E, Kukuruga D, et al. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. Leukemia. 2004;18:1681-1686.

4. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain

reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am J Hematol.* 2006;81:735-746.

5. Huisman C, de Weger RA, de Vries L, et al. Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39:285-291.

6. Horky O, Mayer J, Kablaskova L, et al. Increasing hematopoietic microchimerism is a reliable indicator of incipient AML relapse. *Int J Lab Hematol.* 2011;33:57-66.

7. Jiang Y, Wan LP, Qin YW, et al. Chimerism status is correlated to acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2014.

28. XÉT NGHIỆM TỶ LỆ MỘC MẢNH GHÉP (CHIMERISM) THEO DÒNG TẾ BÀO BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định % tế bào người cho ở người bệnh sau ghép trên mỗi dòng tế bào T và tủy để điều chỉnh thuốc ức chế miễn dịch, đánh giá tình trạng mọc mảnh ghép và nguy cơ thải ghép cho người bệnh điều trị bằng phương pháp ghép tế bào gốc.

1.2. Nguyên lý

- Sử dụng phương pháp tách tế bào bằng hạt từ, trong đó các hạt từ được gắn kháng nguyên đặc hiệu với mỗi dòng tế bào (tế bào lympho T có kháng nguyên bề mặt đặc hiệu là CD3 sử dụng hạt từ có kháng thể CD3; tế bào tủy có kháng nguyên bề mặt đặc hiệu là CD33 sử dụng hạt từ có kháng thể CD33) để phân lập được riêng biệt các tế bào tế bào T hoặc tế bào dòng tủy. Tiếp đến các tế bào T hoặc tủy được tách DNA và thực hiện kỹ thuật real-time PCR để xác định tỷ lệ % tế bào người cho ở người nhận.

- Ở mức độ phân tử, nguyên lý cơ bản của phân tích mọc mảnh ghép là xác định sự khác biệt về hệ gen giữa người cho và người nhận. Một phần khác biệt rất nhỏ của hệ gen có thể được dùng làm chỉ thị phân tử để phân biệt hai cá thể khác nhau như STR, VNTR, indel.

- Phương pháp Realtime-PCR định lượng tế bào người cho ở người nhận theo dòng tế bào dựa trên chỉ số Cq (là thời điểm đường biểu diễn khuếch đại vượt qua đường huỳnh quang nền) của các chỉ thị phân tử khác biệt giữa người cho và người nhận.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Hóa chất tách dòng tế bào	
Kit định danh cá thể	

2.3. Trang thiết bị

- Hệ thống máy realtime-PCR;
- Máy tính có phần mềm phân tích dữ liệu;
- Máy tách tế bào tự động;
- Bộ lưu điện;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn ;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Tủ lạnh 2°C - 8 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -20 °C;
- Tủ lạnh âm sâu -70 °C;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 µL đến 1000 µL.
- Phần mềm quản lý xét nghiệm;
- Bồn rửa mắt khẩn cấp.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 8-12 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền - sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tách dòng tế bào

Từ mẫu bệnh phẩm, thực hiện tách dòng tế bào lympho hoặc tế bào tủy. Thực hiện theo hướng dẫn đi kèm bộ sinh phẩm sử dụng.

4.1.2 Tách chiết DNA từ dòng tế bào

Tách chiết DNA bằng cột silica-gel hoặc bằng hạt từ trên máy tách tự động. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Đo nồng độ DNA

Đo nồng độ và đánh giá độ tinh sạch của DNA ở bước sóng 260nm và 280nm, hoặc sử dụng chất chỉ thị màu gắn DNA đối với máy đo huỳnh quang.

4.1.4. Thực hiện phản ứng real-time PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng real-time PCR đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1 - 2 giây.

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng real-time PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bỏ sung DNA/RNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA/RNA bỏ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).
- Đặt các ống phản ứng vào máy real-time PCR, chọn chương trình tương thích.
- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.
- Kết thúc quá trình PCR, lưu dữ liệu và loại bỏ ống phản ứng.

4.2. Nhận định kết quả

Kết quả xác định chỉ thị phân tử khác biệt giữa người cho và người nhận trước ghép tế bào gốc tạo máu và kết quả định lượng tế bào người cho ở người nhận sau ghép tế bào gốc tạo máu được tính toán trên phần mềm chuyên dụng, thực hiện theo hướng dẫn đi kèm bộ kit.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
▪ Thao tác pipet không chính xác.	▪ Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
▪ Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.	▪ Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất ▪ Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Kết quả được chấp nhận khi:

- Chứng dương có đường khuếch đại với Ct như khuyến cáo của kit sử dụng; chứng
- Chứng H2O không xuất hiện đường khuếch đại;
- Độ lặp lại của các mẫu tương đương nhau.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Breuer S, Preuner S, Fritsch G, Daxberger H, Koenig M, Poetschger U et al (2012) Early recipient chimerism testing in the T-and NK-cell lineages for risk assessment of graft rejection in pediatric patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 26(3):509-519
2. Blazar BR, Lees CJ, Martin PJ et al (2000) Host T cells resist graft - versus - host disease mediated by donor leukocyte infusions. *J Immunol* 165:4901-4909
3. Bader P, Holle W, Klingebiel T, et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:697-702.
4. Barrios M, Jimenez-Velasco A, Roman-Gomez J, et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica.* 2003;88:801-810.
5. Lamba R, Abella E, Kukuruga D, et al. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. *Leukemia.* 2004;18:1681-1686.
6. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am J Hematol.* 2006;81:735-746.
7. Huisman C, de Weger RA, de Vries L, et al. Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39:285-291

29. XÉT NGHIỆM GEN VỚI ctDNA BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm nhằm đánh giá, phát hiện các đột biến gen sử dụng mẫu máu, dịch cơ thể phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- DNA khối u lưu hành tự do (ctDNA) được tìm thấy trong máu và dịch cơ thể, nó có nguồn gốc từ các tế bào ung thư và khối u. Hầu hết DNA ở trong nhân của tế bào, khi khối u ung thư phát triển, các tế bào chết đi ctDNA được giải phóng ra máu và dịch cơ thể. ctDNA thông thường kích thước nhỏ hơn 200 bp và nồng độ rất thấp khoảng 0,1-1%. Hiện nay, phương pháp sinh thiết lỏng ngày càng nổi bật do lợi ích mà nó mang lại như: i) Phát hiện và chẩn đoán ung thư, sử dụng sinh thiết lỏng giảm thiểu khả năng phải sinh thiết khối u, đặc biệt là đối với những mô ung thư khó can thiệp như não, phổi. ii) hướng tới liệu pháp điều trị đích với từng loại ung thư.

- Giải trình tự gen là kỹ thuật xác định trình tự DNA của các gen cụ thể, mã hoá hoặc không mã hoá cho các protein chức năng cụ thể. Giải trình tự gen thế hệ mới (Next-Generation Sequencing, NGS) là công nghệ cho phép giải mã đồng thời hàng triệu DNA cùng lúc, qua đó giúp nâng cao hiệu suất của quá trình giải mã hệ gen người. Công nghệ giúp khắc phục một số nhược điểm của giải trình tự gen truyền thống: thời gian đọc nhanh hơn, dữ liệu đầu ra lớn, tiết kiệm chi phí.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Ống nghiệm lấy mẫu máu K2 EDTA;
- Ống falcon 15mL;
- Ống falcol 50 mL;

- Đầu côn 10 µl có lọc;
- Đầu côn 20 µl có lọc;
- Đầu côn 200 µl có lọc;
- Đầu côn 1mL có lọc;
- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 2,0 mL tiệt trùng;
- Ống PCR 0,2 mL;
- Ống chuyên dụng đo Qubit 0,5mL;
- Côn sinh học phân tử;
- Xylene;
- Kit tinh sạch thư viện;
- Nước chuyên dụng trong sinh học phân tử;
- Giấy đo pH;
- Tween 20;
- Kit tách ctDNA;
- Kit phát hiện đột biến gen (chuẩn bị thư viện) bằng kỹ thuật NGS;
- Kit xác định nồng độ DNA sợi đôi;
- Kit kiểm tra tính toàn vẹn của bộ gen;
- Kit kiểm tra kích thước thư viện;
- Kit chạy máy NGS;
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet bán tự động có thể điều chỉnh 0,1 - 10µl, 10 - 100µl, 200 - 1000µl;
- Tủ thao tác PCR;
- Tủ lạnh 4°C;
- Tủ lạnh -20°C;
- Giá để ống;
- khay giữ lạnh;
- Thùng rác đựng đầu côn và hoá chất;
- Máy ly tâm;

- Máy vortex;
- Máy Spin down;
- Máy đo nồng độ DNA;
- Tủ an toàn sinh học;
- Hệ thống NGS.

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu máu; mẫu dịch cơ thể khác.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.
- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: ví dụ họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, kết quả chẩn đoán giải phẫu bệnh (nếu có)

2.6. Thời gian thực hiện xét nghiệm

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng từ 120 đến 168 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo an toàn cho người thực hiện xét nghiệm, dự phòng nguy cơ trước, trong và sau phơi nhiễm.
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- An toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Đảm bảo đầy đủ bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất.
- Đảm bảo an toàn sinh học.
- Đảm bảo các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Lập biểu mẫu

Lập danh sách mẫu xét nghiệm và điền các bước thực hiện xét nghiệm đột biến gen từ mẫu máu bằng kỹ thuật NGS.

4.2. Chuẩn bị môi trường làm việc

- Khử nhiễm dụng cụ, thiết bị, bề mặt, không gian làm việc.
- Kiểm tra và chuẩn bị đủ vật tư tiêu hao và dụng cụ cần thiết.

4.3. Chuẩn bị mẫu ctDNA

- Quy trình tách chiết để thu được ctDNA tinh sạch theo Kit tách ctDNA
- Đánh giá nồng độ và chất lượng ctDNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm sử dụng bộ kit chuyên dùng.
- Lấy các mẫu ctDNA đã tách chuẩn bị cho xét nghiệm đột biến gen từ mẫu máu bằng kỹ thuật NGS.

4.4. Thực hiện kỹ thuật NGS

- Tạo thư viện: DNA/RNA, ctDNA cần giải trình tự được tách chiết và cắt thành các mảnh nhỏ (nếu cần), khuếch đại qua PCR. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và gắn các adapter cần thiết. Sản phẩm ghép nối được khuếch đại thư viện và tinh sạch sử dụng cho quá trình giải trình tự. Thư viện được kiểm tra và đánh giá chất lượng, nồng độ.

- Tạo cluster: mỗi sợi DNA được giữ lại trên bề mặt thiết bị giải trình tự (flowcell) bằng adapter đã được gắn trước đó. Mỗi sợi DNA sau khi được khuếch đại sẽ tạo thành một cụm DNA (cluster) có trình tự giống hệt nhau để sử dụng cho quá trình giải trình tự.

- Giải trình tự: Sản phẩm được đưa lên hệ thống NGS theo hướng dẫn của kit chuyên dụng.

- Phân tích kết quả:

+ Kết quả từ quá trình giải trình tự được phân tích dựa trên phần mềm chuyên dụng được thiết kế dành riêng cho bộ kit.

+ Kiểm tra mẫu chứng, sau đó phân tích các mẫu xét nghiệm.

+ Phiên giải kết quả, phân loại biến thể đột biến, độ sâu phân tích.

+ Đối chiếu biến thể phân tích với các cơ sở dữ liệu về gen trên thế giới.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:
- + Thực hiện lấy lại mẫu.
- + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu.
- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng:
- + Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình.
- + Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết.

5.2 Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.
- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Kiểm tra lại chất lượng DNA/RNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3 Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả.
- Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
 - Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm;
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm
3. Boycott, K., Vanstone, M., Bulman, D. et al. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. Nat Rev Genet 14, 681-691 (2013)

4. Lin C., Liu X., Zheng B., Ke R., and Tzeng C.M. Liquid Biopsy, ctDNA Diagnosis through NGS. *Life (Basel)*. 2021; 11(9): 890.
5. Chen M. & Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Human Genomics* volume 13, Article number: 34 (2019)

30. XÉT NGHIỆM LAI TẠI CHỖ GẮN MÀU (ISH)

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm bằng phương pháp lai tại chỗ (ISH) sử dụng chuỗi DNA, RNA bổ sung hoặc chuỗi axit nucleic biến đổi được đánh dấu để định vị trình tự DNA hoặc RNA cụ thể trong mô, trong tế bào, các tế bào khối u tuần hoàn để phục vụ cho chẩn đoán, điều trị, tiên lượng bệnh.

1.2. Nguyên lý

- ISH (In situ hybridization): Lai tại chỗ là kỹ thuật sử dụng các đầu dò gắn môi có trình tự bổ sung với trình tự đích quan tâm trên DNA hoặc RNA. Kết quả quá trình lai cho phép xác định sự có mặt, số lượng cũng như tương quan vị trí của các trình tự đích.

- Sử dụng kính hiển vi quang học để biện giải kết quả xét nghiệm. Các kết quả dương tính hỗ trợ trong phân loại mẫu bệnh bình thường và bất thường, và được dùng bổ sung với các xét nghiệm mô/tế bào bệnh học truyền thống khác.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Nhân lực

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Sinh phẩm, vật tư

2.2.1. Sinh phẩm

Tên hóa chất	Mục đích sử dụng
Mẫu dò (Probe)	Mẫu dò gắn đặc hiệu RNA cần phát hiện
iView Blue Detection Kit	Tạo tín hiệu xanh cho mRNA mục tiêu
ISH protease 3	Enzyme phá màng nhân
Red Counterstain II	Dung dịch nhuộm tương phản
EZ prep (10X)	Dung dịch khử paraffin

LCS	Dung dịch dầu bao phủ lên tiêu bản mô, ngăn hóa chất bốc hơi
Reaction Buffer (10X)	Dung dịch rửa tiêu bản
CC2	Đệm xử lý tế bào
SSC (10X)	Dung dịch xử lý tế bào
RNA Positive Control Probe	Mẫu dò lai mRNA chứng dương
Negative Control Probe	Mẫu dò lai chứng âm
Positive Specimen Slides	Tiêu bản mẫu chứng dương

2.2.2. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường.
- Lam kính chuyên dụng cho kỹ thuật hóa mô miễn dịch.
- Lamelle.
- Bút chì.
- Que dàn bệnh phẩm.
- Khay đá.
- Giá để tiêu bản.
- Ống li tâm 1,5 mL;
- Đầu côn 20 µl có lọc.
- Đầu côn 200 µl có lọc.
- Đầu côn 1mL có lọc.
- Khăn sạch.
- Găng tay.
- Nhãn in.
- Nước cất.

2.3. Trang thiết bị:

- Hệ thống máy nhuộm HMMD có chức năng nhuộm lai tại chỗ.
- Máy cắt lát mỏng: cần kiểm tra các ốc vít và tra dầu bôi trơn;

- Bể nước dần bệnh phẩm ở 50°C- 60°C (bể chuyên dụng hoặc có thể sử dụng nồi nấu lẩu để ở mức nhiệt thấp nhất);
- Máy nhuộm tự động có các bể nhuộm được cài đặt theo từng loại bệnh phẩm;
- Máy đo độ pH điện tử;
- Kính hiển vi quang học 1 đầu và nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn mô bệnh học;
- Vòi nước chảy, các dụng cụ và thuốc tẩy trùng để làm sạch dụng cụ;
- Tủ ấm 37°C và 56°C;
- Tủ lạnh;
- Bộ pipet dùng trong sinh học phân tử;
- Tủ hút cho phòng xét nghiệm;
- Bể ổn nhiệt;
- Máy vortex;
- Máy sấy lam.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:

- Bệnh phẩm là các mẫu nên có vùng u cần lai hai màu để đánh giá.
- Khối nên bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
 - + Bệnh phẩm được cố định ngay sau khi mổ trong formalin trung tính 10% với thời gian tối ưu là 6h-14h, nhằm đảm bảo chất lượng Nucleic acid trong tế bào được giữ nguyên trạng thái, đồng thời không bị tiêu hủy do enzyme nội sinh.
 - + Các quy trình mô bệnh học tạo ra khối nên phải đảm bảo đúng thời gian và kỹ thuật.
 - + Mô u đủ số lượng để nhuộm (>100 tế bào).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:

Ghi theo quy định. Ví dụ một số thông tin chung như: họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại, khoa phòng, yêu cầu xét nghiệm, chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng (nếu có), các kết quả cận lâm sàng khác (nếu có), loại mẫu ...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:

Tổng thời gian ước tính: 3 ngày, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 1 ngày;
- Thời gian nhuộm: 1 ngày;

- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 2 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN:

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của từng phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất, ...
- Áp dụng các quy định về an toàn sinh và quản lý chất thải y tế.
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm, ...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Cắt mẫu có độ dày 4 μm , lát cắt dày hơn 4 μm có thể cần xử lý protease mạnh hơn so với khuyến cáo và có thể xuất hiện bong bóng nhân do paraffin dư thừa trong mô.

- Khôi nền bệnh phẩm của người bệnh cắt mảnh và dán lên 2 tiêu bản có sẵn mẫu chứng âm và mẫu chứng dương. Cắt 1 tiêu bản để thực hiện kỹ thuật nhuộm hematoxylin - Eosin thông thường. Mẫu chứng giúp đánh giá tiêu bản xét nghiệm nhuộm đạt hay không đạt.

+ Tiêu bản chứa chứng dương để xác định sự bảo tồn mRNA trên mẫu người bệnh. Nếu tiêu bản này âm tính có nghĩa là mRNA trên mô bệnh không còn được bảo tồn, mRNA bị phá hủy.

+ Tiêu bản chứng âm sử dụng để đánh giá kết quả nhuộm nền, nhuộm không đặc hiệu trên mô bệnh.

4.2. Quy trình nhuộm tự động:

Bước 1: Tiền xử lý mẫu mô: 28 phút;

Bước 2: Ly giải màng nhân ISH Protease: 4 phút;

Bước 4: Biến tính DNA: 4 phút;

Bước 5: Phản ứng lai (Hybridization): 6 giờ, nhiệt độ ủ 72°C;

Bước 6: Thực hiện phản ứng khuếch đại bạc: 16 phút;

Bước 7: Hiện thị màu (Silver Chromogen): 4 phút;

Bước 8: Thực hiện phản ứng khuếch đại tín hiệu đỏ: 24 phút;

Bước 9: Hiển thị màu (Red Chromogen): 8 phút;

Bước 10: Nhuộm tương phản bằng hematoxylin: 8 phút;

Bước 11: Làm xanh nhân: 4 phút;

Bước 12: Làm trong, gắn lamen.

4.3. Nhận định kết quả và báo cáo

4.3.1. Đọc kết quả

- Quy trình nhuộm tự động tạo ra sản phẩm phản ứng màu xanh kết tủa tại vị trí DNA hoặc RNA đích.

- Bác sĩ giải phải đánh giá chứng âm và chứng dương trước khi đọc kết quả trên mẫu bệnh phẩm. Nếu lam chứng nhuộm màu không thích hợp, thì kết quả nhuộm trên mẫu bệnh được coi là không hợp lệ. Lưu ý không nên sử dụng vật kính 100X.

+ Kiểm tra lam chứng dương trước để xác định rằng tất cả các thuốc thử đang hoạt động đúng. Sự hiện diện của sản phẩm phản ứng màu xanh trong các tế bào đích là dấu hiệu của phản ứng dương tính.

+ Chứng âm được kiểm tra sau chứng dương để xác minh tính đặc hiệu của phản ứng. Không nên có bất kỳ sự nhuộm màu đặc hiệu nào trên chứng âm. Nếu nhuộm màu xảy ra, nó cho thấy phản ứng chéo không đặc hiệu với các tế bào hoặc các thành phần của tế bào. Các tế bào nguyên vẹn nên được sử dụng để đọc kết quả nhuộm màu vì các tế bào hoại tử hoặc thoái hóa thường bắt màu không đặc hiệu.

- Kết quả đánh giá trên mẫu bệnh phải được đánh giá cùng với Negative reagent control dưới kính hiển vi quang học.

+ Kết quả là âm tính khi không phát hiện được chuỗi DNA hoặc RNA trong tế bào đích.

+ Kết quả dương tính là sự xuất hiện của tín hiệu màu xanh trong tế bào đích. Hình thái mô học của mẫu nên được đánh giá cùng tiêu bản nhuộm H&E.

4.3.2. Báo cáo, trả kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm

- Trả kết quả theo các quy trình liên quan. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu khối nén và tiêu bản theo quy trình Lưu và hủy bệnh phẩm Giải phẫu bệnh và thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước xét nghiệm

5.1.1. Mẫu phẩm không đủ u (dưới 100 tế bào) hoặc chất lượng không đạt:

- Nguyên nhân: Do mảnh sinh thiết quá nhỏ hoặc do các bước trong quy trình giải phẫu bệnh không đạt làm bệnh phẩm có thể mất kháng nguyên.

- Khắc phục: Đánh giá bằng tiêu bản nhuộm Hematoxylin nếu không đạt cần chọn lại mẫu phẩm khác của người bệnh. Nếu không có mẫu phẩm khác cần sinh thiết lại (nếu có thể). Nếu không thể sinh thiết lại cần khuyến cáo bác sĩ chỉ định.

5.1.2. Những sai sót về hoá chất, trang thiết bị

Hoá chất phải được đảm bảo đúng khuyến cáo của nhà sản xuất, theo dõi môi trường bảo quản. Trang thiết bị được hiệu chuẩn, hiệu chỉnh định kì. Các sai sót về hoá chất, vật tư, trang thiết bị cần khắc phục theo quy trình quản lý tương ứng.

5.2. Trong quá trình nhuộm

- Theo dõi quá trình nhuộm của máy để kịp thời xử lý các sự cố khi máy báo lỗi.

- Khi hệ thống báo lỗi, máy dừng hoạt động, cần phải chuyển sang các bước tiếp theo nhuộm bằng tay ngay sau đó, không được để bệnh phẩm trên tiêu bản bị khô.

- Reset lại máy bằng cách khởi động lại hệ thống. Hệ thống lỗi phức tạp mà người sử dụng không có khả năng xử lý cần gọi kỹ sư của hãng để được hỗ trợ kịp thời.

5.3. Sau xét nghiệm

5.3.1. Chứng âm nền:

- Nguyên nhân: Bộc lộ quá mức.

- Khắc phục: Test dải nhiệt độ và thời gian bộc lộ để tìm vị trí nhiệt độ và thời gian tối ưu cho phương pháp nhuộm. Nhuộm lại bệnh phẩm.

5.3.2. Chứng dương âm tính:

- Nguyên nhân: Hóa chất hỏng; bộc lộ kháng nguyên chưa đạt; thời gian phản ứng với kháng thể một quá ngắn; kháng thể một pha loãng lỏng độ chưa tối ưu.

- Khắc phục: Pha lại hóa chất mới; cắt các tiêu bản chứng dương để test tìm ra thời gian bộc lộ kháng nguyên, thời gian phản ứng với kháng thể 1, tỉ lệ pha loãng kháng thể 1 sao cho tối ưu. Nhuộm lại bệnh phẩm.

5.3.3. Tiêu bản chỉ nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm

- Nguyên nhân: Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm.

- Khắc phục: Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió. Nhuộm lại bệnh phẩm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng;
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị;
- Kiểm soát điều kiện môi trường;
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. O'Connor, Clare. "Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)". Nature Education.
2. Gall, JG; Pardue, ML (June 1969). "Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 63 (2): 378-83. Bibcode:1969PNAS...63..378G. doi:10.1073/pnas.63.2.378. PMC 223575. PMID 4895535.
3. Brown, Lindsay A.; Huntsman, David (2007-05-01). "Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions". *Journal of Molecular Histology*. 38 (2): 151-157. doi:10.1007/s10735-006-9069-y. ISSN 1567-2387. PMID 17216303. S2CID 6363208.
4. Panoskaltsis-Mortari, A.; Bucy, R. P. (February 1995). "In situ hybridization with digoxigenin-labeled RNA probes: facts and artifacts". *BioTechniques*. 18 (2): 300-307. ISSN 0736-6205. PMID 7727134.

5. Jin, L; Lloyd, RV (1997). "In situ hybridization: methods and applications". Journal of Clinical Laboratory Analysis. 11 (1): 2-9. doi:10.1002/(SICI)1098-2825(1997)11:1<2::AID-JCLA2>3.0.CO;2-F. PMC 6760707. PMID 9021518.

6. Comprehensive and annotated in situ hybridization histochemistry
RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis

7. The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging.

31. XÉT NGHIỆM NHIỄM SẮC THỂ PHÂN TỬ BẰNG KỸ THUẬT CISH

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu (CISH) nhằm phát hiện sự hiện diện hay vắng mặt của các vùng DNA cụ thể phục vụ chẩn đoán, điều trị, tiên lượng bệnh.

1.2. Nguyên lý

- CISH (chromogenic in situ hybridization): Lai tại chỗ gắn màu là kỹ thuật sử dụng các đầu dò gắn môi có trình tự bổ sung với trình tự đích quan tâm trên DNA. Kết quả quá trình lai cho phép xác định sự có mặt, số lượng cũng như tương quan vị trí của các trình tự đích.

- Sử dụng kính hiển vi quang học để biện giải kết quả xét nghiệm. Các kết quả dương tính hỗ trợ trong phân loại mẫu bệnh bình thường và bất thường, và được dùng bổ sung với các xét nghiệm mô/tế bào bệnh học truyền thống khác.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Nhân lực

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Sinh phẩm, vật tư

2.2.1. Sinh phẩm

Tùy theo loại máy, hóa chất của từng hãng.

Tên hóa chất	Mục đích sử dụng
Mẫu dò (Probe)	Mẫu dò gắn đặc hiệu RNA cần phát hiện
iView Blue Detection Kit	Tạo tín hiệu xanh cho mRNA mục tiêu
ISH protease 3	Enzyme phá màng nhân
Red Counterstain II	Dung dịch nhuộm tương phản
EZ prep (10X)	Dung dịch khử paraffin
LCS	Dung dịch dầu bao phủ lên tiêu bản mô, ngăn hóa chất bốc hơi
Reaction Buffer (10X)	Dung dịch rửa tiêu bản
CC2	Đệm xử lý tế bào

SSC (10X)	Dung dịch xử lý tế bào
RNA Positive Control Probe	Mẫu dò lai mRNA chứng dương
Negative Control Probe	Mẫu dò lai chứng âm
Positive Specimen Slides	Tiêu bản mẫu chứng dương

2.2.2. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần;
- Lam kính thường;
- Lam kính chuyên dụng cho kỹ thuật hóa mô miễn dịch;
- Lamelle;
- Bút chì;
- Que tãi bệnh phẩm;
- Khay đá;
- Giá để tiêu bản;
- Ống li tâm 1,5 mL;
- Đầu côn 20 µl có lọc;
- Đầu côn 200 µl có lọc;
- Đầu côn 1mL có lọc;
- Khăn sạch;
- Găng tay;
- Nhãn in;
- Nước cất.

2.3. Trang thiết bị:

- Hệ thống máy nhuộm tương thích cho xét nghiệm này.
- Máy cắt lát mỏng: cần kiểm tra các ốc vít và tra dầu bôi trơn.
- Bể nước đun bệnh phẩm ở 50°C- 60°C
- Máy nhuộm tự động có các bể nhuộm được cài đặt theo từng loại bệnh phẩm;
- Máy đo độ pH điện tử;
- Kính hiển vi quang học 1 đầu và nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn mô bệnh học;
- Vòi nước chảy, các dụng cụ và thuốc tẩy trùng để làm sạch dụng cụ;

- Tủ ấm 37°C và 56°C;
- Tủ lạnh;
- Bộ pipet dùng trong sinh học phân tử;
- Tủ hút cho phòng xét nghiệm;
- Bể ổn nhiệt;
- Máy vortex;
- Máy sấy lam;

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:

- Bệnh phẩm là các mẫu nên có vùng u cần lai hai màu để đánh giá.
- Khối nên bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
 - + Bệnh phẩm được cố định ngay sau khi mổ trong formalin trung tính 10% với thời gian tối ưu là 6h-14h, nhằm đảm bảo chất lượng Nucleic acid trong tế bào được giữ nguyên trạng thái, đồng thời không bị tiêu hủy do enzyme nội sinh.
 - + Các quy trình mô bệnh học tạo ra khối nên phải đảm bảo đúng thời gian và kỹ thuật.
 - + Mô u đủ số lượng để nhuộm (>100 tế bào).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Ghi đầy đủ các thông tin theo quy định.
- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, yêu cầu xét nghiệm ...
 - Chẩn đoán lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác (nếu có), loại mẫu....

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

- Tổng thời gian ước tính: 3 ngày, trong đó:
- Thời gian chuẩn bị mẫu: 1 ngày;
 - Thời gian nhuộm: 1 ngày;
 - Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 2 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của từng phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất ...

- Áp dụng các quy định về an toàn sinh và quản lý chất thải y tế.
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm ...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Cắt mẫu có độ dày 4 μm , lát cắt dày hơn 4 μm có thể cần xử lý protease mạnh hơn so với khuyến cáo và có thể xuất hiện bong bóng nhân do paraffin dư thừa trong mô.

- Khối nền bệnh phẩm của người bệnh cắt mảnh và dán lên 2 tiêu bản có sẵn mẫu chứng âm và mẫu chứng dương. Cắt 1 tiêu bản để thực hiện kỹ thuật nhuộm hematoxylin - Eosin thông thường. Mẫu chứng giúp đánh giá tiêu bản xét nghiệm nhuộm đạt hay không đạt.

+ Tiêu bản chứa chứng dương để xác định sự bảo tồn mRNA trên mẫu người bệnh. Nếu tiêu bản này âm tính có nghĩa là mRNA trên mô bệnh không còn được bảo tồn, mRNA bị phá hủy.

+ Tiêu bản chứng âm sử dụng để đánh giá kết quả nhuộm nền, nhuộm không đặc hiệu trên mô bệnh.

4.2. Quy trình nhuộm tự động:

Bước 1: Tiền xử lý mẫu mô: 28 phút.

Bước 2: Ly giải màng nhân ISH Protease: 4 phút.

Bước 4: Biến tính DNA: 4 phút.

Bước 5: Phản ứng lai (Hybridization): 6 giờ, nhiệt độ ủ 72°C.

Bước 6: Thực hiện phản ứng khuếch đại bạc: 16 phút.

Bước 7: Hiện thị màu (Silver Chromogen): 4 phút.

Bước 8: Thực hiện phản ứng khuếch đại tín hiệu đỏ: 24 phút.

Bước 9: Hiện thị màu (Red Chromogen): 8 phút.

Bước 10: Nhuộm tương phản bằng hematoxylin: 8 phút.

Bước 11: Làm xanh nhân: 4 phút.

Bước 12: Làm trong, gắn lamen.

4.3. Nhận định kết quả và báo cáo

4.3.1. Đọc kết quả

- Quy trình nhuộm tự động tạo ra sản phẩm phản ứng màu xanh kết tủa tại vị trí DNA hoặc RNA đích.

- Bác sĩ giải phẫu bệnh phải đánh giá chứng âm và chứng dương trước khi đọc kết quả trên mẫu bệnh phẩm. Nếu lam chứng nhuộm màu không thích hợp, thì kết quả nhuộm trên mẫu bệnh được coi là không hợp lệ. Lưu ý không nên sử dụng vật kính 100X.

+ Kiểm tra lam chứng dương trước để xác định rằng tất cả các thuốc thử đang hoạt động đúng. Sự hiện diện của sản phẩm phản ứng màu xanh trong các tế bào đích là dấu hiệu của phản ứng dương tính.

+ Chứng âm được kiểm tra sau chứng dương để xác minh tính đặc hiệu của phản ứng. Không nên có bất kỳ sự nhuộm màu đặc hiệu nào trên chứng âm. Nếu nhuộm màu xảy ra, nó cho thấy phản ứng chéo không đặc hiệu với các tế bào hoặc các thành phần của tế bào. Các tế bào nguyên vẹn nên được sử dụng để đọc kết quả nhuộm màu vì các tế bào hoại tử hoặc thoái hóa thường bắt màu không đặc hiệu.

- Kết quả đánh giá trên mẫu bệnh phải được đánh giá cùng với Negative reagent control dưới kính hiển vi quang học.

+ Kết quả là âm tính khi không phát hiện được chuỗi DNA hoặc RNA trong tế bào đích.

+ Kết quả dương tính là sự xuất hiện của tín hiệu màu xanh trong tế bào đích. Hình thái mô học của mẫu nên được đánh giá cùng tiêu bản nhuộm H&E.

4.3.2. Báo cáo, trả kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm

- Trả kết quả theo các quy trình liên quan. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu khối nén và tiêu bản theo quy trình Lưu và hủy bệnh phẩm Giải phẫu bệnh và thời gian quy định

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước xét nghiệm

5.1.1. Mẫu phẩm không đủ u (dưới 100 tế bào) hoặc chất lượng không đạt:

- Nguyên nhân: Do mảnh sinh thiết quá nhỏ hoặc do các bước trong quy trình giải phẫu bệnh không đạt làm bệnh phẩm có thể mất kháng nguyên.

- Khắc phục: Đánh giá bằng tiêu bản nhuộm Hematoxylin nếu không đạt cần chọn lại mẫu phẩm khác của người bệnh. Nếu không có mẫu phẩm khác cần sinh thiết lại (nếu có thể). Nếu không thể sinh thiết lại cần khuyến cáo bác sĩ chỉ định.

5.1.2. Những sai sót về hoá chất, trang thiết bị

Hoá chất phải được đảm bảo đúng khuyến cáo của nhà sản xuất, theo dõi môi trường bảo quản. Trang thiết bị được hiệu chuẩn, hiệu chỉnh định kì. Các sai sót về hoá chất, vật tư, trang thiết bị cần khắc phục theo Quy trình quản lý tương ứng.

5.2. Trong quá trình nhuộm

- Theo dõi quá trình nhuộm của máy để kịp thời xử lý các sự cố khi máy báo lỗi.

- Khi hệ thống báo lỗi, máy dừng hoạt động, cần phải chuyển sang các bước tiếp theo nhuộm bằng tay ngay sau đó, không được để bệnh phẩm trên tiêu bản bị khô.

- Reset lại máy bằng cách khởi động lại hệ thống. Hệ thống lỗi phức tạp mà người sử dụng không có khả năng xử lý cần gọi kỹ sư của hãng để được hỗ trợ kịp thời.

5.3. Sau xét nghiệm

5.3.1. Chứng âm nền:

- Nguyên nhân: Bộc lộ quá mức.

- Khắc phục: Test dải nhiệt độ và thời gian bộc lộ để tìm vị trí nhiệt độ và thời gian tối ưu cho phương pháp nhuộm. Nhuộm lại bệnh phẩm.

5.3.2. Chứng dương âm tính:

- Nguyên nhân: Hóa chất hỏng; bộc lộ kháng nguyên chưa đạt; thời gian phản ứng với kháng thể một quá ngắn; kháng thể một pha loãng độ chưa tối ưu.

- Khắc phục: Pha lại hóa chất mới; cắt các tiêu bản chứng dương để test tìm ra thời gian bộc lộ kháng nguyên, thời gian phản ứng với kháng thể 1, tỉ lệ pha loãng kháng thể 1 sao cho tối ưu. Nhuộm lại bệnh phẩm.

5.3.3. Tiêu bản chỉ nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm:

- Nguyên nhân: Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm.

- Khắc phục: Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió. Nhuộm lại bệnh phẩm.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng;
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị;
- Kiểm soát điều kiện môi trường;
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C: Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. Lab Invest. 2002, 82: 1007-1014.
2. Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, Abrams J: Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of Her-2/neu oncogene in breast cancer. Am J Clin Pathol. 2003, 119: 381-387.
3. Tanner, M; Gancberg, D; Di Leo, A; Larsimont, D; Rouas, G; Piccart, M. J.; Isola, J (2000). "Chromogenic in situ hybridization: A practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples". The American Journal of Pathology. 157 (5): 1467-72. doi:10.1016/S0002-9440(10)64785-2. PMC 1885742. PMID 11073807.

32. XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT PCR-RFLP

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định các biến đổi di truyền (nếu có) bằng kỹ thuật PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms hay Phản ứng khuếch đại chuỗi dài-đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn), phục vụ chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật PCR-RFLP là kỹ thuật PCR kết hợp với phân tích đa hình đoạn DNA đích dựa trên vị trí cắt của enzyme cắt giới hạn. Các biến đổi di truyền nằm ở vị trí nhận biết của enzyme giới hạn bên trong sản phẩm PCR sẽ được xác định thông qua kỹ thuật này. Kỹ thuật này gồm hai bước: Bước PCR khuếch đại vùng gen đích (01) và xử lý sản phẩm PCR bằng enzyme giới hạn (02) để phân tích biến thể.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

Hóa chất, sinh phẩm	Điều kiện bảo quản
Kit tách chiết DNA	Theo hướng dẫn của nhà sản xuất
Kit đo nồng độ DNA	
Hóa chất cho phản ứng PCR	
Các cặp mồi đặc hiệu	
Enzym giới hạn	
Đệm điện di (TBE hoặc TAE)	
Loading dye	

Agarose	
Thuốc nhuộm DNA	
Thang DNA chuẩn	

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR;
- Hệ thống chụp ảnh gel;
- Máy tính có phần mềm chụp ảnh gel;
- Bể ổn nhiệt;
- Bộ lưu điện;
- Máy điện di;
- Máy trộn mẫu;
- Máy ly tâm loại để bàn;
- Tủ an toàn sinh học cấp II;
- Máy ủ nhiệt kèm lắc rung;
- Máy Vortex;
- Máy ly tâm Spin down;
- Bộ pipet các kích cỡ từ 1 μ L đến 1000 μ L.
- Tủ lạnh 2°C - 8°C;
- Tủ lạnh âm sâu -20°C;
- Tủ lạnh âm sâu -70°C.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là 1-2 mL máu toàn phần/tủy xương đựng trong ống chống đông EDTA. Bảo quản 2-8°C, giao mẫu đến khoa xét nghiệm trong vòng 24 giờ kể từ khi lấy mẫu.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Ước tính từ lúc bắt đầu cho đến khi kết thúc xét nghiệm: 24 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm Di truyền - Sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Nhân viên phải mang găng tay, khẩu trang và mặc trang phục y tế trong suốt quá trình làm xét nghiệm.

- Phân loại đúng rác thải và loại bỏ rác thải ngay sau quá trình thực hiện xét nghiệm.

- Thực hiện kiểm soát điều kiện môi trường theo “Quy trình theo dõi và kiểm soát điều kiện môi trường”.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1 Tách chiết DNA

Sử dụng các bộ kit thương mại, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.2. Đo nồng độ DNA

Thực hiện các bước kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.3. Thực hiện phản ứng PCR

- Lấy hóa chất cho phản ứng PCR và các cặp mồi đặt trên khay trữ lạnh khoảng 10 phút để rã đông hoàn toàn, trộn nhẹ và ly tâm nhanh trong 1-2 giây.

- Chuẩn bị hồ sơ xét nghiệm, tính toán số lượng các thành phần phản ứng.

- Chuẩn bị các ống PCR 0,2 mL. Ghi mã mẫu lên mỗi ống.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR (thao tác trong tủ an toàn sinh học): sử dụng pipet thêm lần lượt từng hóa chất (theo quy trình đã tối ưu) vào một ống 0,2 mL hoặc 1,5 mL. Trộn đều ống hỗn hợp và chia hóa chất đã pha vào mỗi ống phản ứng (số lượng hóa chất chia vào mỗi ống thực hiện theo quy trình đã tối ưu).

- Bổ sung DNA vào mỗi ống tương ứng (nồng độ DNA bổ sung vào mỗi ống PCR theo hướng dẫn tại quy trình đã tối ưu).

- Đặt các ống phản ứng vào máy PCR, chọn chương trình PCR tương thích.

- Lau chùi mặt sàn tủ an toàn sinh học bằng cồn 70%.

- Khi chương trình PCR kết thúc, lấy các ống phản ứng ra khỏi máy luân nhiệt.

- Điện di kiểm tra sản phẩm hoặc bao quản sản phẩm PCR ở nhiệt độ 2-8°C.

4.1.4. Điện di trên gel agarose

- Chuẩn bị bản gel agarose ở nồng độ thích hợp
- Nhỏ mẫu vào các vị trí tương ứng trên bản gel, nhỏ mẫu DNA chuẩn (DNA ladder) tương thích.
- Tiến hành điện di ở thời gian và điều kiện điện thế phù hợp
- Chụp ảnh bản gel và chú thích tên mẫu, ngày xét nghiệm, loại xét nghiệm

4.1.5. Cắt sản phẩm PCR với enzym giới hạn

- Chuẩn bị ống phản ứng cắt enzym với các thành phần và thể tích theo hướng dẫn đi kèm.
- Ủ mẫu cắt ở nhiệt độ và thời gian thích hợp với mỗi loại enzym.

4.1.6. Điện di sản phẩm cắt

- Chuẩn bị bản gel agarose ở nồng độ thích hợp.
- Nhỏ mẫu vào các vị trí tương ứng trên bản gel, nhỏ mẫu DNA chuẩn (DNA ladder) tương thích.
- Tiến hành điện di ở thời gian và điều kiện điện thế phù hợp.
- Chụp ảnh bản gel và chú thích tên mẫu, ngày xét nghiệm, loại xét nghiệm.

4.2. Nhận định kết quả

- Chỉ phân tích kết quả mẫu xét nghiệm khi các mẫu đối chứng trong phản ứng đạt yêu cầu.
- Phân tích kết quả mẫu xét nghiệm dựa vào kích thước của các băng sản phẩm PCR trước cắt và sau cắt. Dựa vào kích thước sản phẩm thu được sau cắt để nhận biết sự có mặt hay không có mặt của các biến thể gen mong muốn.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

SAI SÓT	XỬ TRÍ
▪ Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	▪ Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.

▪ Sai sót trong dán mã xử lý mẫu dẫn đến nhầm mẫu, sót mẫu	▪ Kiểm tra đúng thông tin hành chính khi gán mã
▪ Lây nhiễm trong quá trình PCR cho kết quả âm tính/dương tính giả	▪ Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật, thứ tự nhỏ mẫu trong quá trình PCR
▪ Quá trình điện di có thể bị thủng giếng, trôi mẫu, tràn mẫu sang giếng khác	▪ Khi nhỏ mẫu để đầu côn ở phía trên bề mặt giếng thạch, không cắm đầu côn sâu vào giếng thạch.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Các mẫu đối chứng đạt yêu cầu khi:

- Đối chứng dương: phải có băng sản phẩm đặc hiệu đúng kích thước.
- Đối chứng âm: không được lên băng có kích thước trùng với loại đột biến tương ứng.
- Chứng H₂O: phải không có băng sản phẩm.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Pourzand C, Cerutti P. Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1993 Jul 1;288(1):113-21.
2. Ghatak S, Muthukumaran RB, Nachimuthu SK. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. Journal of biomolecular techniques: JBT. 2013 Dec;24(4):224.
3. Hashim HO, Al-Shuhaib MB. Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. Journal of applied biotechnology reports. 2019 Dec.

33. XÉT NGHIỆM CÁC GEN BẰNG KỸ THUẬT MLPA

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm các gen bằng kỹ thuật MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) được sử dụng để phát hiện và định lượng các biến thể di truyền liên quan đến bất thường số lượng bản sao của đoạn DNA, phát hiện đột biến mất/thêm/lặp đoạn... hoặc đột biến điểm đã biết trước trong cùng một lần xét nghiệm trên các gen/vùng gen xác định để phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh, hỗ trợ tư vấn di truyền, ứng dụng trong nghiên cứu.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật khuếch đại đa đầu dò dựa trên phản ứng ghép nối (MLPA) là một kỹ thuật bán định lượng được sử dụng để xác định số lượng bản sao của tối đa 60 trình tự DNA đặc hiệu trong cùng một phản ứng.

1.2.2. Nguyên lý

- Tách DNA tổng số dựa trên nguyên tắc phá vỡ màng tế bào, màng nhân bằng các phương pháp vật lý, hóa học để giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA.

- Kỹ thuật MLPA dựa trên phản ứng PCR khuếch đại nhiều đoạn gen khác nhau chỉ với 1 cặp mồi duy nhất. Phản ứng MLPA tạo ra một tập hợp các sản phẩm PCR duy nhất có chiều dài từ 64-500 nt được phân tách bằng điện di mao quản.

- Kỹ thuật MLPA là một kỹ thuật phát hiện sự thay đổi số lượng bản sao bằng cách so sánh chiều cao của các đỉnh tín hiệu đầu dò của phản ứng MLPA. So sánh chiều cao của đỉnh tín hiệu mẫu DNA đích với đỉnh tín hiệu tương ứng của mẫu DNA đối chứng, cung cấp thông tin về trạng thái số lượng bản sao gen của trình tự đích. Việc xóa một hoặc nhiều trình tự đích có thể nhìn thấy khi chiều cao đỉnh giảm tương ứng, trong khi sự gia tăng chiều cao đỉnh phản ánh sự gia tăng số lượng bản sao.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Đầu côn thường và đầu côn có phin lọc (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 10 μ L).
- Ống ly tâm 1,5-2 mL; ống PCR các thể tích (0,2-0,5 mL); mao quản các loại: 50 cm, 70 cm (4 vị trí hoặc 8 vị trí), Khay chứa mẫu 96 giếng.
- Tấm cao su đẩy đĩa chạy mẫu và đẩy khay đệm cho máy điện di mao quản; Khay giữ mẫu các loại (24-48 vị trí): khay giữ lạnh, khay giữ ống 0,5 mL-2mL-15mL-50mL; Bàn thí nghiệm; tủ đựng hóa chất; hộp lưu mẫu; giấy lau máy và giấy lau tay.
- Ống đựng bệnh phẩm: ống chống đông EDTA, ống đựng mẫu vô trùng.; trang bị bảo hộ: găng tay; khẩu trang; mũ giấy; sát khuẩn tay nhanh.
- Chi phí khác: chi phí phần mềm nội bộ của bệnh viện, chi phí hiệu chuẩn trang thiết bị hoặc chi phí đánh giá ISO (nếu có)...

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Hóa chất dùng chung: nước không chứa Nuclease; ethanol 100%.
- Bộ mẫu chứng gồm mẫu chứng không có đột biến, mẫu chứng âm và dương các loại (nếu có).
- Hóa chất tách DNA: kit tách DNA tổng số, ethanol 100% và 70%.
- Hóa chất PCR: hỗn hợp hóa chất sử dụng trong phản ứng PCR (PCR Master mix hoặc enzym Taq DNA Polymerase...); hỗn hợp 4 loại nucleotid (dNTPs Mix...); môi xuôi và môi ngược (50 nmol/ống...).
- Hóa chất MLPA (Salsa MLPA Probemix...); Dung dịch đệm điện di mao quản (Hidi formamide...); Thang chuẩn điện di mao quản (Genscan 500 Liz...); nước không chứa Nuclease (DNAase/ RNAase free water).
- Hóa chất điện di mao quản: khay đệm cho cực âm và cực dương máy điện di mao quản (Anode Buffer Container (ABC), Cathode Buffer Container (CBC); đệm cho máy điện di mao quản (POP-7 Polymer for 3500/3500xL Genetic

Analyzers...); hóa chất căn chỉnh cho máy điện di mao quản (DS-33 Matrix Standard (Dye set G5)...).

- Bảo quản và sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Trang thiết bị

- Pipets các thể tích: 0,1-1 μ L; 1-10 μ L; 1-20 μ L; 10-200 μ L; 0,1-1 mL.
- Tủ sạch/ Tủ ATSH cấp 1/ Tủ ATSH cấp 2, Tủ hút hóa chất.
- Hệ thống điện di mao quản, máy luân nhiệt PCR 96 giếng, máy tách DNA tự động; máy quang phổ đo DNA/RNA, hệ thống điện di, hệ thống chụp ảnh gel điện di kèm phần mềm.
- Máy ly tâm: máy ly tâm thường; máy ly tâm lạnh; máy ly tâm mini spin; máy ly tâm đĩa; Tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C ; -40°C ; -80°C).
- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; nồi khử trùng ướ; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh; máy in tem mã vạch.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi; dòng tế bào dịch ối sau nuôi cấy; các bệnh phẩm khác: nước bọt, niêm mạc má, mẫu u, gai rau, máu cuống rốn; DNA tổng số, sản phẩm PCR.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Máu ngoại vi: 0,5-2 mL, đựng trong ống EDTA vô trùng.
 - + Các bệnh phẩm khác: đựng trong ống đựng bệnh phẩm vô trùng.
 - + DNA tổng số, sản phẩm PCR: lượng DNA tối thiểu 10 ng/ μ L.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.
- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

6,2 giờ.

2.7. Đại điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học: mặc áo vô trùng, đeo khẩu trang, kính bảo hộ, mũ bảo hộ, găng tay khi thực hiện xét nghiệm.

- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất hóa chất, thiết bị.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung cho các bước thực hiện xét nghiệm:
 - + khay giữ lạnh; khay đựng ống ly tâm đáy nhọn 1,5 mL và ống PCR, bút viết.
 - + Găng tay, cồn tuyệt đối và cồn 70°C, sát khuẩn tay nhanh, đăng kí sử dụng tủ an toàn sinh học và máy luân nhiệt PCR, máy giải trình tự gen.
 - + Ghi tên người bệnh/mã số người bệnh lên các ống PCR hoặc ống ly tâm.
 - + Phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có): tính tổng số hóa chất cần pha để thực hiện 1 lần xét nghiệm hoặc xét nghiệm cho 1 mẫu bệnh phẩm.
- Các bước được thực hiện bởi 1 nhân viên chính và 1 nhân viên giám sát.

4.1.1. Tách DNA tổng số

- DNA tổng số có thể thực hiện theo 2 cách: tách bằng kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tách thủ công sử dụng các loại hóa chất tương đương như enzyme protease, hóa chất tẩy rửa mạnh (SDS...), dung dịch đệm ly giải, cồn.... Các bước thực hiện như sau:

- Biến tính và phân giải protein: thêm lượng mẫu cần thiết vào ống đã chứa enzyme hoặc hóa chất tương đương nhằm phá màng tế bào và màng nhân; bổ sung dung dịch đệm (nếu cần), trộn đều và ủ ở nhiệt độ phù hợp.

- Loại bỏ protein: protein sau biến tính sẽ được kết tủa và phân lớp hoặc giữ lại trên cột lọc.

- Thu axit nucleic: sử dụng cồn hoặc hóa chất tương đương để tủa DNA hoặc hòa tan DNA và được thu lại bằng cách ly tâm ở tốc độ phù hợp. DNA được hòa tan trong dung dịch phù hợp (nước khử enzyme hoặc dung dịch tương đương) và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Kiểm tra chất lượng DNA tổng số bằng điện di hoặc quang phổ kế.

4.1.2. Thực hiện kỹ thuật MLPA

- Rã đông các hóa chất: Để hóa chất tan từ từ trên khay giữ lạnh đến khi hóa chất tan hoàn toàn rồi bảo quản trong khay giữ lạnh.

- Chuẩn bị bộ mẫu cần chạy (ở nhiệt độ phòng) bao gồm: mẫu chứng âm; mẫu chứng dương (nếu có); mẫu trắng; mẫu bệnh phẩm.

- Thực hiện phản ứng MLPA theo các bước sau:

Bước 1: Biến tính DNA

- Lấy lượng DNA cần thiết (50- 200 ng DNA) cho vào ống PCR 0,2 mL đã ghi tên và thực hiện biến tính DNA tổng số theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bước 2: Lai các đầu dò

- Pha hỗn hợp hóa chất lai đầu dò theo các thành phần theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Hỗn hợp đầu dò	
Dung dịch đệm	
Tổng thể tích	

- Chia 3 μL hóa chất lai chứa đầu dò đã pha vào các ống PCR chứa DNA đã biến tính và trộn đều bằng pipet.

- Ủ mẫu theo chu trình nhiệt theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Bước 3: Phản ứng ghép nối

- Pha hỗn hợp hóa chất ghép nối theo các thành phần theo khuyến cáo của nhà sản xuất:

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Nước không chứa Nuclease	
Dung dịch đệm 1	
Dung dịch đệm 2	
Dung dịch đệm 3	
Tổng thể tích	

- Giữ mẫu ở nhiệt độ 54°C, thêm thể tích cần thiết (ví dụ 16μL...) dung dịch ghép nối trên vào mỗi mẫu và trộn đều.

- Thực hiện chu trình nhiệt theo khuyến cáo của nhà sản xuất:

Bước 4: Phản ứng PCR

- Pha hỗn hợp dung dịch PCR theo các thành phần theo khuyến cáo của nhà sản xuất:

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Nước không chứa Nuclease	
Hỗn hợp trình tự môi	
Enzyme tổng hợp DNA sợi đôi	
Tổng thể tích	

- Giữ mẫu ở nhiệt độ 20°C, chia thể tích cần thiết (ví dụ 6 μL...) hỗn hợp PCR vào mỗi mẫu, sau đó trộn đều bằng pipet và thực hiện phản ứng PCR.

- Thực hiện chu trình nhiệt PCR theo khuyến cáo của nhà sản xuất:

Lưu ý: Sản phẩm PCR có thể được bảo quản tránh ánh sáng ở 4°C trong 1 tuần.

Trong thời gian dài hơn có thể bảo quản ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C.

4.1.3. Điện di sản phẩm MLPA bằng máy điện di mao quản

- Khởi động máy điện di mao quản, thiết lập chương trình trên máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Pha hỗn hợp dung dịch điện di mao quản theo theo khuyến cáo của nhà sản xuất:

Hóa chất	Số lượng (μL)/ mẫu
Dung dịch đệm điện di mao quản	
Thang chuẩn điện di mao quản	
Sản phẩm PCR	
Tổng thể tích	

- Hút thể tích dung dịch điện di mao quản vừa pha (10 μL...) và nhỏ vào các giếng trên khay chứa mẫu, đậy nắp và đặt khay chứa mẫu vào đúng vị trí trên máy điện di mao quản.

- Tiến hành chạy máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.4. Thu thập dữ liệu và phân tích

- Kết quả phản ứng MLPA được thu thập và lưu trữ theo quy định.
- Phân tích kết quả MLPA bằng phần mềm chuyên dụng.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả QC

a. Tách DNA

Lượng DNA tổng số được đo trên máy quang phổ đo DNA/RNA tại bước sóng $OD_{260/280nm} \geq 10$ ng và độ tinh sạch DNA trong khoảng 1,8-2,0.

b. Điện di sản phẩm MLPA

Kiểm tra tín hiệu rõ ràng, không nhiễu, kích thước dải tín hiệu tối ưu, tối thiểu và tối đa cho các thiết bị điện di mao quản và các tín hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

a. Đọc kết quả

- Kết quả được phân tích theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Tỷ lệ tín hiệu (Final Ratio - FR) được phân tích bằng việc so sánh các tín hiệu các đoạn của mẫu bệnh phẩm với đoạn tương ứng của mẫu đối chứng.
- Độ lệch chuẩn của từng đoạn so với các đoạn tham chiếu phải $\leq 0,10$.
- Phân tích tỷ lệ tín hiệu tại vị trí các đầu dò và mối tương quan giữa kiểu gen
- số bản sao gen theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

b. Nhận định kết quả

- Danh pháp của các biến thể được viết theo hướng dẫn của HGVS.
- Dựa vào số bản sao của mỗi đoạn để kết luận kiểu gen tương ứng: Không phát hiện đột biến/ Dị hợp tử đột biến/ Đồng hợp tử đột biến/ Dị hợp tử kép...

4.2.3. Phiên giải và báo cáo kết quả

- Phiên giải kết quả theo hướng dẫn ACMG.
- Báo cáo kết quả theo hướng dẫn của các quy trình liên quan.

4.2.4. Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Đối chiếu kết quả kiểu gen và kiểu hình theo quy trình liên quan.
- Tư vấn di truyền hoặc thực hiện thêm xét nghiệm nếu cần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.

- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và lấy lại mẫu bệnh phẩm
Đổ mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, - Lấy lại mẫu bệnh phẩm
Thiếu mẫu	- Mẫu bị thất lạc - Đổ mẫu	- Báo cáo lãnh đạo khoa, ghi nhận sự việc, khử nhiễm và liên hệ người bệnh lấy lại mẫu
Mẫu không đạt	- Sai ống đựng mẫu/Sai mẫu bệnh phẩm - Vận chuyển sai quy định - Bảo quản sai quy định	- Lấy lại mẫu bệnh phẩm - Lấy lại mẫu, đào tạo nhân viên vận chuyển mẫu - Lấy lại mẫu, kiểm tra và hiệu chuẩn thiết bị bảo quản mẫu

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Sai quy trình kỹ thuật	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và thực hiện lại quy trình kỹ thuật

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Hóa chất không đạt	- Bảo quản sai/hết hạn	- Chuẩn bị lại hóa chất - Đào tạo nhân viên sử dụng và bảo quản hóa chất.
Thiết bị dừng đột ngột	- Máy hỏng - Mất điện - Thiếu hóa chất chạy máy	- Sử dụng máy khác cùng chức năng để thực hiện lại xét nghiệm và kiểm tra thiết bị định kì, - Đảm bảo nguồn điện ưu tiên và thực hiện lại PCR - Bổ sung hóa chất và khởi động lại máy xét nghiệm
Nhiễm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật và an toàn sinh học	- Xử lý lại mẫu và thực hiện lại xét nghiệm - Giám sát và kiểm tra chéo
Lượng DNA không đạt	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo - Ít mẫu - Do tính chất bệnh hoặc thuốc điều trị của người bệnh	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo - Lấy lại mẫu
Độ DNA	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo	- Thực hiện lại quy trình tách DNA - Kiểm tra và đánh giá nhân viên liên tục
Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Đào tạo liên tục và kiểm tra chéo
Sản phẩm MLPA	- Hóa chất hết hạn sử dụng/không được	- Thực hiện lại MLPA; đào tạo lại nhân viên trong bảo quản và sử dụng hóa chất.

Nguyên cơ	Nguyên nhân	Xử trí
không đúng kích thước/không đặc hiệu	bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất - Nhầm mẫu/ hóa chất - Thao tác của nhân viên chưa đạt/chưa đúng	- Lấy lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Đào tạo và kiểm tra liên tục
Mẫu nội kiểm không đạt	- Sử dụng sai mẫu nội kiểm - Sai chu trình nhiệt - Sai mẫu bệnh phẩm	- Chọn lại mẫu nội kiểm và thực hiện lại kỹ thuật - Thực hiện lại phản ứng - Lấy lại mẫu/tách lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
Tín hiệu các đầu dò trên mức tín hiệu tối ưu	- Quá nhiều sản phẩm PCR	- Giảm thời gian điện di/ hiệu điện thế - Sử dụng ít sản phẩm PCR hơn (Tối đa 10% tổng thể tích mẫu điện di) - Pha loãng sản phẩm PCR
Các đỉnh của đầu dò MLPA dốc xuống	- Bay hơi trong gia đoạn lai qua đêm - Bay hơi trong bước phản ứng nối - Tạp chất từ mẫu DNA	- Kiểm tra nắp gia nhiệt - Sử dụng đầu ngăn bay hơi, đảm bảo ống PCR đóng chặt. - Giảm thời gian thao tác mở nắp (sử dụng pipet đa kênh) - Pha loãng hoặc tinh sạch DNA
Không có sản phẩm MLPA	- Hóa chất hết hạn/bảo quản sai quy định - Nồng độ hóa chất không đúng - Nhân viên không tuân thủ quy trình - Mất điện	- Kiểm tra hóa chất trước khi sử dụng, pha lại PCR - Thực hiện lại phản ứng MLPA trên máy khác

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
	- Máy hỏng	
Phân tích kết quả không chính xác	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo	- kiểm tra và phân tích chéo kết quả xét nghiệm hoặc xin ý kiến của bác sĩ lâm sàng.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
Báo cáo sai kết quả xét nghiệm	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/ chưa được đào tạo - Lựa chọn sai biểu mẫu báo cáo kết quả	- Thực hiện lại quy trình kỹ thuật nếu cần. - Kiểm tra chéo kết quả - Báo cáo lãnh đạo khoa và sửa lại báo cáo kết quả.
Trả nhầm kết quả xét nghiệm của người bệnh khác	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Báo cáo lãnh đạo và lấy lại mẫu để thực hiện lại xét nghiệm - Đào tạo lại nhân viên
Mất kết quả xét nghiệm	- Nhân viên để sai vị trí lưu kết quả - Nhân viên trả nhầm cho người bệnh khác	- Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác - Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Giá trị báo động/nguy hiểm: Lượng DNA tổng số $< 1\text{ng}/\mu\text{L}$, độ tinh sạch ($\text{OD}_{260/280\text{nm}}$) ngoài khoảng từ 1,8-2,0.
- Mẫu nội kiểm đạt chất lượng.
- Chất lượng tín hiệu chạy điện di mao quản đạt yêu cầu.
- Phân tích và kiểm tra chéo trước khi phê duyệt kết quả.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Eijk-Van Os PG, Schouten JP. (2011) Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) for the detection of copy number variation in genomic sequences. *Methods Mol Biol*.
2. Trần Đức Phần và cs. 2021. “Di truyền Y học”. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
4. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
5. Tiêu chuẩn ISO 15189:2022.
6. Hướng dẫn HGVS: <https://hgvs-nomenclature.org/>.

34. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ GEN

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xác định trình tự của một gen đích hoặc một trình tự của đoạn gen để phát hiện đột biến trên gen, phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa

Kỹ thuật giải trình tự là kỹ thuật giải trình tự cho 1 đoạn gen đã biết bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp.

1.2.2. Nguyên lý

- Tách DNA tổng số dựa trên nguyên tắc phá vỡ màng tế bào, màng nhân bằng các phương pháp vật lý, hóa học để giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA, và thu nhận DNA tinh sạch bằng hóa chất phù hợp.

- Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) được thực hiện dựa trên nguyên tắc bổ sung và nhờ hoạt động của enzyme polymerase.

- Dựa vào đặc tính cấu trúc của các axit nucleic là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác dụng của điện trường không đổi chúng sẽ di chuyển về cực dương. Tốc độ di chuyển của chúng trên bản thạch agarose phụ thuộc vào kích thước DNA và nồng độ bản thạch.

- Giải trình tự gen Sanger dựa trên nguyên lý “kết thúc chuỗi” để tổng hợp các trình tự nucleotide sợi đơn trong một phản ứng có ddNTPs. Việc tổng hợp trình tự diễn ra bằng cách làm dừng ngẫu nhiên khi mỗi loại ddNTP được gắn vào, kết quả là tạo ra các đoạn DNA sợi đơn hơn kém nhau một nucleotide. Các trình tự đoạn DNA được đọc bằng hệ thống điện di mao quản tự động.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

- Đầu côn thường và đầu côn có phin lọc (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 10 μ L).
- Ống ly tâm các loại (1,5-2 mL; 15 mL; 50 mL...); ống PCR các thể tích (0,2-0,5 mL...); Chai duran các thể tích.
- Bộ mao quản các loại: 50 cm, 70 cm (4 vị trí hoặc 8 vị trí...). Khay chứa mẫu 96 giếng.
- Tấm cao su đẩy đĩa chạy mẫu và khay đệm cho máy điện di mao quản.
- Khay giữ mẫu các loại (24-48 vị trí): khay giữ lạnh, khay giữ ống 0,5 mL-2mL-15mL-50mL.
- Bàn thí nghiệm; tủ đựng hóa chất; hộp lưu mẫu; giấy lau máy và lau tay.
- Ống đựng mẫu (Ống chống đông EDTA vô trùng...), trang bị bảo hộ cá nhân (găng tay; khẩu trang; mũ giấy); băng dính giấy; giấy in kết quả, sát khuẩn tay nhanh.
- Vật tư khác: chi phí phần mềm nội bộ của bệnh viện, chi phí hiệu chuẩn trang thiết bị hoặc chi phí đánh giá ISO (nếu có)...

2.2.2. Hóa chất/sinh phẩm

- Nước không chứa Nuclease; ethanol 100%, Ethanol 70%, nước cất 2 lần.
- Bộ mẫu chứng gồm mẫu chứng không có đột biến, mẫu chứng âm và dương các loại (nếu có).
- Hỗn hợp hóa chất pha PCR (PCR Master mix, Taq, dNTPs, Mg^{2+} ...); 4 loại nucleotid tự do (dNTPs mix...); trình tự môi xuôi và môi ngược (5'-3').
- Hóa chất điện di: thạch điện di (Agarose); đệm màu tra mẫu điện di DNA (Loading dye) (nồng độ 5X/6X/10X...); dung dịch đệm điện di; thuốc nhuộm huỳnh quang (ethidium bromide, red safe...); thang đo DNA chuẩn (DNA ladder) các loại (1 kb, 100 bp...).
- Hóa chất tách DNA/kit tách DNA tổng số; hóa chất tinh sạch sản phẩm PCR sợi đôi và sợi đơn, hóa chất giải trình tự gen.
- Hóa chất điện di mao quản: khay đệm cho cực âm và cực dương máy điện di mao quản; đệm điện di mao quản; hóa chất căn chỉnh cho máy điện di mao quản.
- Hóa chất được sử dụng và bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Trang thiết bị

- Pipets với các thể tích: 0,1-2,5 μL ; 1-10 μL ; 10-200 μL ; 100-1000 μL .
- Tủ sạch/tủ ATSH cấp 1/tủ ATSH cấp 2, tủ hút.
- Hệ thống điện di mao quản, máy luân nhiệt PCR 96 giếng, máy tách DNA tự động; máy quang phổ đo DNA/RNA, hệ thống điện di, hệ thống chụp ảnh điện di kèm phần mềm.
- Máy ly tâm thường; máy ly tâm lạnh; máy ly tâm mini spin; máy ly tâm đĩa; tủ lạnh và tủ âm các loại (-20°C ; -40°C ; -80°C).
- Thiết bị phụ trợ: máy lắc; tủ ổn nhiệt khô; bể ổn nhiệt nước; nồi khử trùng ướ; tủ sấy khô; cân điện tử; lưu điện; nhiệt ẩm kế; nhiệt kế; máy in ảnh; máy in tem mã vạch; phần mềm quản lý bệnh viện.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: máu ngoại vi; dòng tế bào dịch ối sau nuôi cấy; các bệnh phẩm khác: nước bọt, niêm mạc má, mẫu u, gai rau, DNA tổng số, sản phẩm PCR.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm:
 - + Các bệnh phẩm khác: máu ngoại vi, gai nhau, mô, tế bào niêm mạc má, máu cuống rốn, mẫu u... đựng trong ống đựng mẫu vô trùng có chất bảo quản phù hợp.
 - + DNA tổng số, sản phẩm PCR đạt lượng theo quy định.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Kiểm tra phiếu chỉ định: kiểm tra thông tin theo quy định.
- Kiểm tra ống đựng bệnh phẩm: kiểm tra thông tin theo quy định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

13,8 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo nguyên tắc an toàn sinh học.
- Đảm bảo an toàn theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

- Chuẩn bị chung cho các bước thực hiện xét nghiệm:
 - + khay giữ lạnh/khay đựng ống ly tâm đáy nhọn 1,5 mL và ống PCR, bút.
 - + Găng tay, cồn 96°C, cồn 70°C, sát khuẩn tay nhanh, đăng kí sử dụng tủ an toàn sinh học và máy luân nhiệt PCR, máy điện di mao quản.
 - + Ghi tên người bệnh/mã số người bệnh lên các ống PCR/ống ly tâm.
 - + Phiếu theo dõi thực hiện xét nghiệm (nếu có): tính tổng số hóa chất cần pha để thực hiện 1 lần xét nghiệm hoặc xét nghiệm cho 1 mẫu bệnh phẩm.
- Các bước được thực hiện bởi 1 nhân viên chính và 1 nhân viên giám sát.

4.1.1. Tách DNA tổng số

DNA tổng số có thể thực hiện theo 2 cách: tách bằng kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tách thủ công sử dụng các loại hóa chất tương đương (như enzyme protease, hóa chất tẩy rửa mạnh (SDS...)), dung dịch đệm ly giải, cồn.... Các bước thực hiện như sau:

- Biến tính và phân giải protein: thêm lượng mẫu cần thiết vào ống đã chứa enzyme hoặc hóa chất tương đương nhằm phá màng tế bào và màng nhân; bổ sung dung dịch đệm (nếu cần), trộn đều và ủ ở nhiệt độ phù hợp.
- Loại bỏ protein: protein sau biến tính sẽ được kết tủa và phân lớp hoặc giữ lại trên cột lọc.
- Thu axit nucleic: sử dụng cồn hoặc hóa chất tương đương để tủa DNA hoặc hòa tan DNA và được thu lại bằng cách ly tâm ở tốc độ phù hợp. DNA được hòa tan trong dung dịch phù hợp (nước khử enzyme hoặc dung dịch tương đương) và bảo quản ở nhiệt độ -20 °C.
- Kiểm tra chất lượng DNA tổng số bằng điện di hoặc quang phổ kế.

4.1.2. Thực hiện kỹ thuật PCR

- Rã đông các hóa chất và chuẩn bị mẫu cần chạy (ở nhiệt độ phòng) bao gồm: mẫu chứng âm; mẫu chứng dương (nếu có); mẫu trắng; mẫu bệnh phẩm.
- Tính số hóa ống cần chuẩn bị và thể tích hóa chất cần pha cho người bệnh và mẫu nội kiểm. Thể tích cho mỗi phản ứng gồm các thành phần sau:

Hóa chất	Thể tích (μL)/ phản ứng
dH ₂ O	
Hỗn hợp hóa chất pha phản ứng PCR	
Mồi xuôi (10 μmol)	
Mồi ngược (10 μmol)	
DNA tổng số	
Tổng thể tích	

- Chia đều hóa chất PCR ra ống PCR 0,2 mL và bổ sung DNA tổng số của người bệnh và các mẫu chứng cần thiết vào ống PCR, chuyển các ống PCR vào máy luân nhiệt PCR và chạy theo chương trình nhiệt của từng xét nghiệm.

4.1.3. Điện di sản phẩm PCR

- Chuẩn bị dung dịch đệm 1 X.
- Sử dụng bản thạch agarose thương mại hoặc chuẩn bị bản thạch agarose với nồng độ thích hợp.

+ Lắp lược vào các khay đổ thạch và điều chỉnh khay cân bằng.
+ Cân lượng thạch agarose cần thiết, và bổ sung dung dịch đệm với thể tích tương ứng với nồng độ thạch cần dùng và đun nóng dung dịch cho đến khi toàn bộ agarose trong dung dịch tan hoàn toàn.

+ Làm nguội dung dịch đến khoảng 50-70°C và thêm thuốc nhuộm DNA vào dung dịch agarose, lắc đều (trường hợp không bổ sung thuốc nhuộm DNA, sau điện di bản thạch sẽ ngâm trong dung dịch thuốc nhuộm DNA) rồi đổ toàn bộ dung dịch thạch agarose vào khuôn đã được cài sẵn lược, để bản thạch nguội ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút.

- Điện di sản phẩm PCR
+ Đổ dung dịch đệm 1X vào bể điện di sao cho dung dịch đệm cao hơn mặt bản thạch khoảng 2-5 mm.

+ Dùng pipet hút 1 thể tích thuốc nhuộm và trộn đều với 5 thể tích sản phẩm PCR. Sau đó, dùng pipet hút toàn bộ mẫu và nhỏ mẫu vào từng giếng trên bản thạch. Đặt nắp bể điện di và cắm điện cực vào nguồn điện di và điện di mẫu trong khoảng thời gian và điện thế thích hợp.

- Chụp ảnh sản phẩm điện di: đưa bản thạch vào máy chụp ảnh gel, đóng nắp, bật đèn UV và chụp theo hướng dẫn của nhà sản xuất; lưu hình ảnh điện di hoặc in ảnh (nếu cần); vệ sinh các dụng cụ điện di bằng cồn 70°C.

4.1.4. Tinh sạch sản phẩm PCR

- Quá trình tinh sạch sản phẩm PCR sợi đôi bằng kit thương mại và tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Sản phẩm PCR tinh sạch được bảo quản ở 4°C trong trường hợp dùng ngay hoặc lưu trữ ở -20°C.

- Kiểm tra sản phẩm PCR đã tinh sạch bằng phương pháp điện di.

4.1.5. Pha hóa chất PCR sợi đơn

- Pha hóa chất PCR sợi đơn gồm các thành phần sau:

Hóa chất	Số lượng (μL)/ phản ứng
dH ₂ O	
Hóa chất giải trình tự gen	
5X buffer	
Mỗi đơn (10 μmol)	
Sản phẩm PCR tinh sạch	
Tổng thể tích	

- Chuyển các ống PCR vào máy gia nhiệt và chạy theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

4.1.6. Tinh sạch sản phẩm PCR sợi đơn

Tinh sạch sản phẩm PCR sợi đơn bằng kit thương mại và thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.7. Điện di mao quản

- Khởi động máy điện di mao quản, thiết lập chương trình trên máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Hút thể tích cần thiết (10-20 μL) sản phẩm PCR sợi đơn đã tinh sạch và nhỏ vào các giếng trên khay chứa mẫu.

- Đóng nắp và đặt khay chứa mẫu vào đúng vị trí trên máy điện di mao quản, tiến hành chạy máy điện di mao quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.1.8. Thu thập dữ liệu trình tự gen và phân tích

- Thu thập các trình tự gen sau khi điện di mao quản.
- Lựa chọn trình tự gen tham chiếu phù hợp trên ngân hàng gen quốc tế để so sánh với trình tự gen cần phân tích bằng phần mềm chuyên dụng.
- Trình tự gen được phân tích độc lập bởi 2 nhân viên khác nhau.

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Xem xét kết quả QC

a. Tách DNA

DNA đạt chất lượng khi lượng DNA đo tại bước sóng $OD_{260/280nm} \geq 10$ ng và độ sạch trong khoảng 1,8-2,0.

b. PCR

- Sử dụng thạch agarose và thang DNA chuẩn phù hợp với kích thước của đoạn gen quan tâm.

- Kết quả điện di sản phẩm PCR phải rõ ràng, đúng kích thước lý thuyết, mẫu Blank control (BC) không có băng, mẫu chứng nội kiểm, mẫu bệnh phẩm xuất hiện băng có kích thước đúng kích thước lý thuyết.

c. Tinh sạch

Sản phẩm PCR tinh sạch được kiểm tra bằng điện di và được sử dụng ngay để giải trình tự gen hoặc bảo quản ở $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

d. Giải trình tự gen

- Tín hiệu rõ ràng, nằm trong giới hạn khuyến cáo của nhà sản xuất
- Trình tự gen thu được tối thiểu phải bắt đầu từ trình tự môi nếu trình tự không bị mất đoạn tại vị trí bắt cặp của môi.

4.2.2. Đọc kết quả và nhận định kết quả

a. Đọc kết quả

- Kết quả được phân tích độc lập bởi 2 nhân viên khác nhau.
- Phân tích trình tự gen bằng phần mềm chuyên dụng kèm theo máy hay phần mềm thương mại (Chromas, mutation surveyor...). So sánh trình tự gen đích với trình tự gen tham chiếu và xác định sự thay đổi trên trình tự gen đích nếu có và xác định biến thể trên gen:

+ Xác định loại đột biến gen.

- + Xác định vị trí xảy ra đột biến trên cDNA và sự thay đổi của các axit amin liên quan đến đột biến.
- Ghi nhận kết quả phân tích vào hồ sơ tương ứng của người bệnh.

b. Nhận định kết quả

- Danh pháp của các biến thể được viết theo hướng dẫn của HGVS.
- Nhận định kiểu gen tương ứng (đồng hợp tử, dị hợp tử hoặc không phát hiện đột biến...).

4.2.3. Phiên giải và báo cáo kết quả

- Phiên giải kết quả giải trình tự theo hướng dẫn của ACMG.
- Báo cáo kết quả theo quy trình liên quan.

4.2.4. Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường

- Đối chiếu kết quả kiểu gen và kiểu hình theo quy định.
- Tư vấn di truyền hoặc thực hiện thêm xét nghiệm nếu cần.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

4.3.1. Trả kết quả

- Báo cáo kết quả xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình liên quan, lưu hồ sơ và ghi vào biểu mẫu cần thiết và lưu hồ sơ xét nghiệm.
- Kết quả xét nghiệm cần được kiểm tra chéo, phê duyệt trước khi trả.

4.3.2. Lưu trữ hồ sơ

Hồ sơ xét nghiệm được lưu theo quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
- Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và lấy lại mẫu bệnh phẩm
- Đổ mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, - Lấy lại mẫu bệnh phẩm

- Thiếu mẫu	- Mẫu bị thất lạc - Đổ mẫu	- Báo cáo lãnh đạo khoa, ghi nhận sự việc, khử nhiễm và liên hệ người bệnh lấy lại mẫu
- Mẫu không đạt	- Sai ống đựng mẫu/Sai mẫu bệnh phẩm - Vận chuyển sai quy định - Bảo quản sai quy định	- Lấy lại mẫu bệnh phẩm - Lấy lại mẫu, đào tạo nhân viên vận chuyển mẫu - Lấy lại mẫu, kiểm tra và hiệu chuẩn tủ bảo quản mẫu

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
- Sai quy trình kỹ thuật	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
- Hóa chất không đạt	- Bảo quản sai/hết hạn	- Chuẩn bị lại hóa chất - Đào tạo nhân viên sử dụng và bảo quản hóa chất.
- Thiết bị dừng đột ngột	- Máy hỏng - Mất điện - Thiếu hóa chất chạy máy	- Sử dụng máy khác cùng chức năng để thực hiện lại xét nghiệm và kiểm tra thiết bị định kì, - Đảm bảo nguồn điện ưu tiên và thực hiện lại PCR - Bổ sung hóa chất và thực hiện lại xét nghiệm.
- Nhiễm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình kỹ thuật và an toàn sinh học	- Xử lý lại mẫu và thực hiện lại xét nghiệm - Giám sát và kiểm tra chéo

- Lượng DNA không đạt	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo - Không sử dụng đúng dung dịch hòa tan DNA khi căn chỉnh máy đo DNA. - Do tính chất bệnh hoặc thuốc điều trị.	- Đào tạo nhân viên liên tục, kiểm tra chéo - Căn chỉnh lại máy đo bằng dung dịch hòa tan DNA và đo lại. - Lấy lại mẫu
- Độ DNA	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Thực hiện lại quy trình tách DNA - Kiểm tra và đánh giá nhân viên liên tục
- Nhầm mẫu	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Đào tạo liên tục và kiểm tra chéo
- Sản phẩm PCR không đúng kích thước/không đặc hiệu	- Hóa chất hết hạn sử dụng/không được bảo quản đúng quy định của nhà sản xuất - Nhầm mẫu - Thao tác của nhân viên chưa đạt/chưa đúng	- Thực hiện lại PCR; đào tạo lại nhân viên trong bảo quản và sử dụng hóa chất. - Lấy lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Đào tạo và kiểm tra liên tục
- Mẫu nội kiểm không đạt	- Sử dụng sai mẫu nội kiểm - Sai chu trình nhiệt - Sai mẫu bệnh phẩm	- Chọn lại mẫu nội kiểm và thực hiện lại kỹ thuật - Thực hiện lại PCR - Lấy lại /tách lại mẫu và thực hiện lại quy trình kỹ thuật
- PCR không có sản phẩm	- Hóa chất hết hạn/bảo quản sai quy định	- Kiểm tra hóa chất trước khi sử dụng, pha lại PCR

	- Nồng độ hóa chất không đúng - Nhân viên không tuân thủ quy trình - Mất điện - Máy hỏng	- Đào tạo và giám sát nhân viên, pha lại PCR - Đào tạo và kiểm tra liên tục và thực hiện lại quy trình kỹ thuật - Thực hiện lại PCR - Sửa máy và thực hiện lại PCR
- Sai thang chuẩn	- Nhân viên chưa được đào tạo/không tập trung	- Chọn lại thang chuẩn và điện di lại sản phẩm PCR
- Không có sản phẩm sau điện di	- Sai chu trình nhiệt - Sai điện cực điện di - Dung dịch đệm không đạt	- Thực hiện lại PCR - Điện di lại - Chuẩn bị lại dung dịch đệm và điện di lại
- Không có sản phẩm tinh sạch sau điện di	- Nhân viên không tuân thủ quy trình - Sai điện cực điện di - Dung dịch đệm không đạt	- Thực hiện PCR và tinh sạch lại. - Điện di lại - Chuẩn bị lại dung dịch đệm và điện di lại
- Phân tích và nhận định sai kết quả	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Phân tích lại, đào tạo lại nhân viên, kiểm tra chéo kết quả.
- Trình tự gen không đạt	- Lượng DNA khuôn quá ít/nhiều - Hóa chất điện di mao quản quá hạn - Kỹ thuật của nhân viên chưa chuẩn	- Tiến hành lại phản ứng PCR - Thay hóa chất điện di mao quản hoặc thay mao quản - Đào tạo lại nhân viên và kiểm tra, giám sát

- Không có trình tự gen	- Sai phương pháp chạy - Sai trình tự môi - Sai sót về kỹ thuật của nhân viên	- Chọn lại phương pháp chạy - Pha lại hóa chất PCR và/hoặc giải trình tự gen - Đào tạo lại nhân viên và kiểm tra, giám sát
-------------------------	---	--

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Nguy cơ	Nguyên nhân	Xử trí
- Sai thông tin người bệnh	- Nhân viên không tuân thủ quy trình - Do nhập liệu sai trên hệ thống của bệnh viện	- Đối chiếu thông tin người bệnh và hồ sơ xét nghiệm và sửa lại thông tin người bệnh - Liên hệ phòng CNTT hỗ trợ sửa thông tin người bệnh và in lại kết quả xét nghiệm
- Báo cáo sai kết quả xét nghiệm	- Nhân viên không tuân thủ quy trình/chưa được đào tạo	- Thực hiện lại quy trình kỹ thuật nếu cần. - Phân tích và nhận định lại - Kiểm tra chéo kết quả
- Trả nhầm kết quả xét nghiệm của người bệnh khác	- Nhân viên không tuân thủ quy trình	- Báo cáo lãnh đạo và lấy lại mẫu để thực hiện lại xét nghiệm - Đào tạo lại nhân viên
- Mất kết quả xét nghiệm	- Nhân viên để sai vị trí lưu kết quả - Nhân viên trả nhầm cho người bệnh khác	- Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác - Kiểm tra lại hồ sơ xét nghiệm và in lại bản kết quả khác

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Giá trị báo động/nguy hiểm:
 - + Lượng DNA tổng số < 10 ng/μL, độ tinh sạch (OD260/280nm) ngoài khoảng từ 1,8-2,0.
 - + Hóa chất hết hạn sử dụng.
 - + Kết quả điện di mao quản không có tín hiệu.
- Tiêu chuẩn đánh giá: mẫu đạt khi đảm bảo các yêu cầu sau:
 - + Mẫu trắng (BC) không có băng khi PCR.
 - + Các mẫu chứng nội kiểm có kích thước đúng kích thước lý thuyết.
 - + Sản phẩm PCR được điện di cùng thang chuẩn phù hợp, rõ ràng.
 - + Tín hiệu các nucleotide trong giới hạn cho phép, chân không bị nhiễu.
 - + Tín hiệu các nucleotide trong giới hạn cho phép, chân không bị nhiễu.
 - + Mẫu nội kiểm PCR có băng đúng kích thước lý thuyết.
 - + Chất lượng tín hiệu chạy điện di mao quản đạt yêu cầu.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Li MM, Cottrell CE, Pullambhatla M, Roy S, et al. 2023. “Assessments of Somatic Variant Classification Using the Association for Molecular Pathology/American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guidelines: A Report from the Association for Molecular Pathology”. J Mol Diagn. 25(2):69-86.
2. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 2001. "Molecular Cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
3. Trần Đức Phấn và cs. 2021. “Di truyền Y học”. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
4. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. 1988. “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science”. 239(4839):487-91.
5. Mullis KB. 1990. “Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction”. Ann Biol Clin (Paris). 48(8):579-82.
6. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory

Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.

7. Tiêu chuẩn ISO 15189:2022.

8. Hướng dẫn HGVS: <https://hgvs-nomenclature.org/>

35. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ ĐƠN GEN BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm này nhằm phát hiện các biến thể đơn gen phục vụ cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Giải trình tự gen là kỹ thuật xác định trình tự DNA của các gen mã hoá hoặc không mã hoá cho các protein chức năng cụ thể. Giải trình tự gen thế hệ mới (Next-Generation Sequencing, NGS) là công nghệ cho phép giải mã đồng thời hàng triệu DNA cùng lúc, qua đó giúp nâng cao hiệu suất của quá trình giải mã hệ gen người. Công nghệ giúp khắc phục một số nhược điểm của giải trình tự gen truyền thống: thời gian đọc nhanh hơn, dữ liệu đầu ra lớn, tiết kiệm chi phí. NGS có nhiều ứng dụng trong y học, bao gồm chẩn đoán, tiên lượng bệnh và định hướng các phương pháp điều trị tiên tiến cho người bệnh đặc biệt là phương pháp điều trị đích trong ung thư.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người.

2.2. Vật tư

- Ống đựng máu chứa chất chống đông K2 EDTA;
- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;
- Lam kính;
- Lưỡi dao mổ;
- Ống falcon 15mL;
- Ống falcol 50 mL;
- Đầu côn 10 µl có lọc;
- Đầu côn 20 µl có lọc;
- Đầu côn 200 µl có lọc;

- Đầu côn 1mL có lọc;
- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 2,0 mL tiệt trùng;
- Ống PCR 0,2 mL;
- Ống chuyên dụng đo Qubit 0,5mL;
- Côn chuyên dụng dùng trong sinh học phân tử;
- Xylene;
- Hóa chất tinh sạch thư viện;
- Nước tinh sạch chuyên dùng trong sinh học phân tử;
- Giấy đo pH;
- Tween 20;
- Kit tách ctDNA, DNA/RNA;
- Kit phát hiện đột biến gen (chuẩn bị thư viện) bằng kỹ thuật NGS;
- Bộ kit xác định nồng độ DNA/RNA;
- Kit kiểm tra tính toàn vẹn của DNA/RNA tổng số;
- Kit kiểm tra kích thước thư viện;
- Kit chạy máy NGS;
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet bán tự động có thể điều chỉnh 1 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 200 - 1000 μ l;
- Tủ thao tác PCR;
- Tủ lạnh 4°C;
- Tủ lạnh -20°C;
- Giá để ống;
- khay giữ lạnh;
- Thùng rác đựng đầu côn và hoá chất;
- Máy ly tâm;
- Máy vortex;
- Máy Spin down;
- Máy đo nồng độ DNA;

- Tủ An toàn sinh học;
- Máy cắt tiêu bản;
- Máy PCR;
- Hệ thống điện di kiểm tra kích thước thư viện;
- Hệ thống NGS;

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô đã được cố định và vùi nền (FFPE); mẫu mô, mẫu máu; mẫu dịch cơ thể khác...
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.
- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu (đối với mẫu máu/dịch cơ thể...).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: ví dụ họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, kết quả chẩn đoán giải phẫu bệnh (nếu có)...

2.6. Thời gian thực hiện xét nghiệm

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng từ 120 giờ đến 168 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo an toàn cho người thực hiện xét nghiệm, dự phòng nguy cơ trước, trong và sau xét nghiệm.
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- An toàn điện và phòng chống cháy nổ.
- Đảm bảo đầy đủ bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất.
- Đảm bảo an toàn sinh học.
- Đảm bảo các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Lập biểu mẫu

Lập danh sách mẫu xét nghiệm và điền các bước thực hiện xét nghiệm giải trình tự đơn gen từ mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật NGS.

4.2. Chuẩn bị môi trường làm việc

- Khử nhiễm dụng cụ, thiết bị, bề mặt, không gian làm việc;
- Kiểm tra và chuẩn bị đủ vật tư tiêu hao và dụng cụ cần thiết.

4.3. Chuẩn bị mẫu DNA/RNA

- Quy trình tách chiết để thu được DNA/RNA, ctDNA tinh sạch theo Kit tách DNA/RNA, ctDNA;

- Đánh giá nồng độ và chất lượng DNA/RNA, ctDNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm sử dụng Qubit® Assay Kit hoặc phương pháp, thiết bị tương đương, ví dụ: NanoDrop...

- Lấy các mẫu DNA/RNA, ctDNA đã tách chuẩn bị cho xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật NGS.

4.4. Thực hiện kỹ thuật NGS:

- Tạo thư viện: DNA/RNA, ctDNA cần giải trình tự được tách chiết và cắt thành các mảnh nhỏ (nếu cần), khuếch đại qua PCR. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và gắn các adapter cần thiết. Sản phẩm ghép nối được khuếch đại thư viện và tinh sạch sử dụng cho quá trình giải trình tự. Thư viện được kiểm tra và đánh giá chất lượng, nồng độ.

- Tạo cluster: mỗi sợi DNA được giữ lại trên bề mặt thiết bị giải trình tự (flowcell) bằng adapter đã được gắn trước đó. Mỗi sợi DNA sau khi được khuếch đại sẽ tạo thành một cụm DNA (cluster) có trình tự giống hệt nhau để sử dụng cho quá trình giải trình tự.

- Giải trình tự: Sản phẩm được đưa lên hệ thống NGS theo hướng dẫn của kit chuyên dụng.

- Phân tích kết quả:

+ Kết quả từ quá trình giải trình tự được phân tích dựa trên phần mềm chuyên dụng được thiết kế dành riêng cho bộ kit.

+ Kiểm tra mẫu chứng, sau đó phân tích các mẫu xét nghiệm.

- + Phiên giải kết quả, phân loại biến thể đột biến, độ sâu phân tích.
- + Đối chiếu biến thể phân tích với các cơ sở dữ liệu về gen trên thế giới.

Nếu sử dụng hệ thống NGS tự động thì toàn bộ các bước từ nạp mẫu, tách chiết mẫu, chuẩn bị thư viện đến giải trình tự, phân tích kết quả sẽ được tự động hoàn toàn theo các bước hướng dẫn của nhà sản xuất.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:
- + Thực hiện lấy lại mẫu
- + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu
- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng
- + Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình
- + Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết

5.2. Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.
- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích
- + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
- + Kiểm tra lại chất lượng DNA/RNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả
- + Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
- + Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù. (nếu có)

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm;

2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm”.

3. Boycott, K., Vanstone, M., Bulman, D. et al. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet* 14, 681-691 (2013)

36. XÉT NGHIỆM GIẢI TRÌNH TỰ ĐA GEN BẰNG KỸ THUẬT NGS

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xét nghiệm được ứng dụng cho các trường hợp cần đánh giá, phát hiện các biến thể trên nhiều gen liên quan đến chẩn đoán, tiên lượng và điều trị bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Giải trình tự gen là kỹ thuật xác định trình tự DNA của các gen cụ thể, mã hoá hoặc không mã hoá cho các protein chức năng cụ thể. Giải trình tự gen thế hệ mới (Next-Generation Sequencing, NGS) là công nghệ cho phép giải mã đồng thời hàng triệu DNA cùng lúc, qua đó giúp nâng cao hiệu suất của quá trình giải mã hệ gen người. Công nghệ giúp khắc phục một số nhược điểm của giải trình tự gen truyền thống: thời gian đọc nhanh hơn, dữ liệu đầu ra lớn, tiết kiệm chi phí. NGS có nhiều ứng dụng trong y học, bao gồm chẩn đoán bệnh, xác định bộ gen của một loài và nhận biết các biến thể gen quan trọng liên quan đến sự phát triển, sức kháng và tiến hóa của các loài, xác định nguồn gốc của các biến thể gen, khám phá quy luật di truyền, và nghiên cứu sự tương tác giữa các gen; trong thú y và nông nghiệp ...

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 02 người

2.2. Vật tư

- Ống đựng máu chứa chất chống đông K2 EDTA;
- Dao cắt bệnh phẩm loại sử dụng một lần;
- Lam kính;
- Lưỡi dao mổ;
- Ống falcon 15mL;
- Ống falcol 50 mL;
- Đầu côn 10 µl có lọc;

- Đầu côn 20 μ l có lọc;
- Đầu côn 200 μ l có lọc;
- Đầu côn 1mL có lọc;
- Ống thu mẫu có nắp 1,5 mL tiệt trùng;
- Ống thu mẫu có nắp 2,0 mL tiệt trùng;
- Ống PCR 0,2 mL;
- Ống chuyên dụng đo Qubit 0,5mL;
- Côn chuyên dụng dùng trong sinh học phân tử;
- Xylene;
- Hóa chất tinh sạch thư viện;
- Nước tinh sạch chuyên dùng trong sinh học phân tử;
- Giấy đo pH;
- Tween 20;
- Kit tách ctDNA, DNA/RNA;
- Kit phát hiện đột biến gen (chuẩn bị thư viện) bằng kỹ thuật NGS;
- Bộ kit xác định nồng độ DNA/RNA;
- Kit kiểm tra tính toàn vẹn của DNA/RNA tổng số;
- Kit kiểm tra kích thước thư viện;
- Kit chạy máy NGS;
- Găng tay cao su không bột tan;
- Giấy lau không bụi.

2.3. Trang thiết bị

- Pipet bán tự động có thể điều chỉnh 1 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 200 - 1000 μ l;
- Tủ thao tác PCR;
- Tủ lạnh 4°C;
- Tủ lạnh -20°C;
- khay giữ lạnh;
- Thùng rác đựng đầu côn và hoá chất;
- Máy ly tâm;
- Máy vortex;
- Máy Spin down;

- Máy đo nồng độ DNA;
- Tủ An toàn sinh học;
- Máy cắt tiêu bản;
- Máy PCR;
- Hệ thống điện di kiểm tra kích thước thư viện;
- Hệ thống NGS.

2.4. Chuẩn bị bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm mô đã được cố định và vùi nền (FFPE); mẫu mô, mẫu máu; mẫu dịch cơ thể khác.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: đảm bảo về điều kiện bảo quản và cách lấy mẫu đúng theo hướng dẫn của bộ kit.
- Quy định vận chuyển, bảo quản, lưu trữ bệnh phẩm, thời gian chuyển đến phòng xét nghiệm: Mẫu được cho vào hộp đựng bệnh phẩm và vận chuyển đến phòng xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy mẫu (đối với mẫu máu/dịch cơ thể).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định, ví dụ một số thông tin chung như họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, kết quả chẩn đoán giải phẫu bệnh (nếu có) ...

2.6. Thời gian thực hiện xét nghiệm

Thời gian thực hiện xét nghiệm từ lúc tiếp nhận bệnh phẩm đến khi trả kết quả khoảng từ 120 giờ đến 168 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện xét nghiệm

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

- Đảm bảo an toàn cho người thực hiện xét nghiệm, dự phòng nguy cơ trước, trong và sau xét nghiệm
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ
- An toàn điện và phòng chống cháy nổ
- Đảm bảo đầy đủ bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất

- Đảm bảo an toàn sinh học
- Đảm bảo các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Lập biểu mẫu

Lập danh sách mẫu xét nghiệm và điền các bước thực hiện xét nghiệm giải trình tự đa gen từ mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật NGS.

4.2. Chuẩn bị môi trường làm việc

- Khử nhiễm dụng cụ, thiết bị, bề mặt, không gian làm việc;
- Kiểm tra và chuẩn bị đủ vật tư tiêu hao và dụng cụ cần thiết.

4.3. Chuẩn bị mẫu DNA/RNA

- Quy trình tách chiết để thu được DNA/RNA, ctDNA tinh sạch theo Kit tách DNA/RNA, ctDNA;
- Đánh giá nồng độ và chất lượng DNA/RNA, ctDNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm sử dụng Qubit® Assay Kit;
- Lấy các mẫu DNA/RNA, ctDNA đã tách chuẩn bị cho xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật NGS.

4.4. Thực hiện kỹ thuật NGS

- Tạo thư viện: DNA/RNA, ctDNA cần giải trình tự được tách chiết và cắt thành các mảnh nhỏ (nếu cần), khuếch đại qua PCR. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và gắn các adapter cần thiết. Sản phẩm ghép nối được khuếch đại thư viện và tinh sạch sử dụng cho quá trình giải trình tự. Thư viện được kiểm tra và đánh giá chất lượng, nồng độ.
- Tạo cluster: mỗi sợi DNA được giữ lại trên bề mặt thiết bị giải trình tự (flowcell) bằng adapter đã được gắn trước đó. Mỗi sợi DNA sau khi được khuếch đại sẽ tạo thành một cụm DNA (cluster) có trình tự giống hệt nhau để sử dụng cho quá trình giải trình tự.
- Giải trình tự: Sản phẩm được đưa lên hệ thống NGS theo hướng dẫn của kit chuyên dụng.
- Phân tích kết quả:
 - + Kết quả từ quá trình giải trình tự được phân tích dựa trên phần mềm chuyên dụng được thiết kế dành riêng cho bộ kit.

- + Kiểm tra mẫu chứng, sau đó phân tích các mẫu xét nghiệm.
- + Phiên giải kết quả, phân loại biến thể đột biến, độ sâu phân tích.
- + Đối chiếu biến thể phân tích với các cơ sở dữ liệu về gen trên thế giới.

Đối với hệ thống NGS tự động hoàn toàn

Quy trình xét nghiệm sẽ tuân theo các bước như hướng dẫn của nhà sản xuất và hướng dẫn của bộ kit. Bao gồm các bước sau:

- Nạp mẫu DNA hoặc cfDNA/ctDNA hoặc RNA sau tách chiết vào cartridge/ hộp hóa chất theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Khai báo thông tin mẫu và chọn bộ xét nghiệm/ bảng gen (gene panel) trên phần mềm điều khiển hệ thống.
- Hệ thống thực hiện tự động các bước: khuếch đại và/hoặc phân mảnh DNA (tùy theo kit); Gắn chỉ số (index) và adapter. Tinh sạch thư viện, định lượng nội bộ và chuẩn bị thư viện. Tiến hành giải trình tự và phân tích kết quả tự động bằng phần mềm phân tích chuyên dụng để nhận diện các biến thể/ đột biến gen.
- Đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu tham chiếu và tiêu chuẩn báo cáo. Lập báo cáo kết quả.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn:
 - + Thực hiện lấy lại mẫu
 - + Đảm bảo yêu cầu về điều kiện vận chuyển và bảo quản mẫu
- Mẫu sau khi tách chiết không đảm bảo chất lượng và số lượng
 - + Thực hiện tách chiết lại theo đúng quy trình
 - + Yêu cầu lấy lại mẫu để tách chiết lại trong trường hợp cần thiết

5.2 Trong khi thực hiện kỹ thuật

- Mẫu đối chứng không đạt:
 - + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
 - + Chạy đánh giá lại bộ kit và mẫu đối chứng.
- Mẫu bệnh phẩm không đạt điều kiện phân tích
 - + Kiểm tra điều kiện bảo hóa chất xét nghiệm.
 - + Kiểm tra lại chất lượng DNA/RNA, tách chiết lại nếu cần thiết.

5.3 Sau khi thực hiện kỹ thuật

Sai sót trong quá trình ghi nhận và trả kết quả

- Kiểm tra lại kết quả đã ghi nhận.
- Thực hiện lại quy trình trả kết quả.

6. YÊU CẦU ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc kiểm tra mẫu mù (nếu có).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 5530/QĐ-BYT ngày 25/12/2015 của Bộ y tế Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn trong quản lý chất lượng xét nghiệm;
2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/08/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
3. Boycott, K., Vanstone, M., Bulman, D. et al. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. Nat Rev Genet 14, 681-691 (2013)

37. XÉT NGHIỆM PHÂN MẢNH DNA TINH TRÙNG

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích kỹ thuật

Xác định mức độ đứt gãy DNA tinh trùng, đánh giá sâu chức năng tinh trùng của người nam giới trong sức khỏe và sinh sản.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Sự phân mảnh DNA tinh trùng (hay còn gọi sự đứt gãy DNA tinh trùng) là tình trạng DNA trong nhân tinh trùng bị đứt gãy mạch đơn hoặc tách mạch đôi. Khi tinh trùng được biến tính bằng axit và loại bỏ protein, DNA trong nhân tinh trùng sẽ tạo thành quang sáng đặc trưng bao quanh đầu tinh trùng (quang halo). Hình ảnh của quang halo cho phép đánh giá các mức độ đứt gãy khác nhau của DNA tinh trùng.

Nguyên lý xét nghiệm phân mảnh DNA tinh trùng (xét nghiệm xác định mức độ đứt gãy DNA tinh trùng) thường dùng là dựa trên phương pháp đánh giá sự phân tán chất nhuộm sắc.

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01 người;
- Kỹ thuật y hoặc tương đương: 01 người.

2.2. Vật tư

- Hóa chất: Bộ kit xác định mức độ đứt gãy DNA tinh trùng, Thuốc nhuộm giêmsa, Cồn 70%, 90% và 100%;
- Đầu côn 100 μ L và 1000 μ L;
- Pipet nhựa;
- Ống thu mẫu 1,5 mL, ống thu mẫu 0,2 mL;
- Lam kính;
- Khẩu trang;
- Găng tay vô trùng;

- Găng tay xử lý dụng cụ, quần áo bảo hộ, dung dịch nước rửa tay, cồn sát khuẩn tay nhanh, dung dịch khử trùng, khăn lau tay;
- Giấy thấm, giấy xét nghiệm, sổ lưu kết quả xét nghiệm, bút viết kính, bút bi.

2.3. Trang thiết bị

- Kính hiển vi quang học
- Máy đếm tế bào
- Tủ lạnh thường
- Tủ âm sâu -200°C
- Bình cách thủy

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Chuẩn bị người bệnh: người bệnh được giải thích về việc lấy mẫu bệnh phẩm, hướng dẫn người bệnh phối hợp để lấy mẫu theo đúng yêu cầu.
- Loại mẫu bệnh phẩm: tinh dịch.
- Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: lọ nhựa vô khuẩn.
- Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: điều kiện nhiệt độ phòng, nếu chưa thực hiện ngay trong vòng 2 giờ, mẫu cần được bảo quản tủ lạnh - 4°C trong vòng 24 giờ.
- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm (thể tích, số lượng, chất lượng...): tinh dịch được lấy vào lọ đựng tinh dịch bằng phương pháp thủ dâm sau 2 - 7 ngày không xuất tinh.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Khoảng 5 giờ

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm di truyền – sinh học phân tử.

3. AN TOÀN

Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình về an toàn xét nghiệm, an toàn điện và phòng tránh cháy nổ, an toàn hóa chất: có bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất (có thể xây dựng quy định riêng nếu cần), an toàn sinh học, an toàn môi trường: đánh giá các yếu tố vi khí hậu như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, tiếng ồn...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Bước 1. Nhận mẫu bệnh phẩm

Kiểm tra thông tin trên mẫu xét nghiệm, đối chiếu với phiếu xét nghiệm.

4.1.2. Bước 2. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất (nếu có)

4.1.3. Bước 3. Đánh giá QC

- Máy móc trang thiết bị được hiệu chuẩn/ kiểm chuẩn 1 lần/năm.
- Hoá chất được bảo quản theo đúng quy định của nhà sản xuất, còn hạn sử dụng và kiểm tra chất lượng định kỳ.

4.1.4. Bước 4. Tiến hành kỹ thuật

Bước 4.1: Pha loãng mẫu tinh dịch bằng PBS 1x: 5 - 10 triệu/mL.

Bước 4.2: Cho 25 μ L mẫu tinh dịch đã pha loãng vào tube chứa Agarose 37°C. Trộn đều bằng pipet.

Bước 4.3: Nhỏ 1 giọt (10 - 15 μ L) hỗn hợp tinh dịch trên lên lam kính (nhỏ trên 2 giếng, mỗi giếng 1 giọt). Đậy lá kính lên (tránh bọt khí).

Bước 4.4: Đặt tiêu bản vào ngăn mát tủ lạnh/ 5 phút: đến khi thạch đông

Bước 4.5: Lấy tiêu bản từ trong tủ lạnh ra, cẩn thận gỡ phiến kính. Để ở nhiệt độ phòng với vị trí tiêu bản nằm ngang cho đến khi khô hoàn toàn.

Bước 4.6: Đặt tiêu bản vào khay chứa dung dịch DA, ngâm trong 7 phút ở nhiệt độ 22 °C (nhiệt độ phòng). Dùng nhíp di chuyển tiêu bản cho thấm đều dung dịch DA.

Bước 4.7: Chuyển tiêu bản sang khay chứa 10mL dung dịch LS, ngâm 25 phút.

Bước 4.8: Chuyển tiêu bản sang khay chứa nước cất để rửa dung dịch LS. Để yên trong nước cất 5 phút.

Bước 4.9: Chuyển tiêu bản lần lượt sang các khay chứa ethanol 70% (2 phút), ethanol 90% (2 phút), ethanol 100% (2 phút).

Bước 4.10: Lấy tiêu bản khỏi khay và để khô tiêu bản ở nhiệt độ phòng.

Bước 4.11: Nhuộm: Giemsa 10%/ 7 - 10 phút.

4.2. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả QC (có thể chạy QC trước hoặc QC song song tùy thuộc loại xét nghiệm): Sử dụng mẫu tinh dịch và thực hiện chứng âm và chứng dương. Chứng âm là chứng mà khi tắt cả vi trường không hiển thị quang sáng halo. Chứng dương là chứng khi tắt cả tinh trùng trong các vi trường đều có quang halo.

- Đọc kết quả và nhận định kết quả

Cần quan sát tối thiểu 500 tinh trùng dưới kính hiển vi quang học với các thông số sau:

Tinh trùng không bị đứt gãy DNA:

+ Tinh trùng với “Halo” rộng - “Halo” halo lớn hơn hoặc bằng kích thước nhân.

+ Tinh trùng với “Halo” trung bình: kích thước halo trung bình.

Tinh trùng bị đứt gãy DNA:

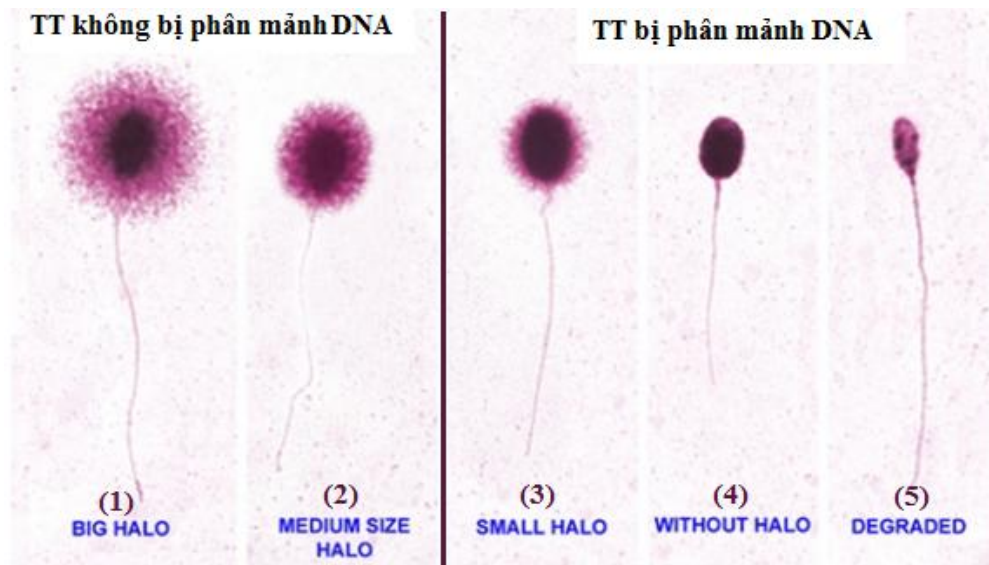
+ Tinh trùng với “Halo” bé - “Halo” bằng 1/3 hoặc bé hơn 1/3 kích thước nhân.

+ Tinh trùng không có “Halo”.

+ Tinh trùng không có “Halo” và suy thoái - có nghĩa là không xuất hiện “Halo”, đồng thời nhân có hình dạng không bình thường và bắt màu thuốc nhuộm yếu.

Sau khi quan sát lam kính dưới kính hiển vi quang học và đếm ít nhất 500 tinh trùng có đuôi trong tinh dịch để xác định độ đứt gãy DNA tinh trùng. Xác định bằng quang halo của tinh trùng theo Fernandez và cộng sự (hình 1). Độ đứt gãy DNA tinh trùng được tính theo công thức sau:

$$DFI = \frac{TT \text{ có halo nhỏ} + TT \text{ không có halo} + TT \text{ thoái hóa}}{\text{Tổng số TT đếm được}} \times 100\%$$



Hình 1. Hình ảnh tinh trùng có quang halo và không có quang halo

(1) Tinh trùng có quang halo lớn (Big halo): Kích thước quang halo $\geq$ đường kính ngang của nhân.

(2) Tinh trùng có quang halo vừa (Medium halo): $1/3$ đường kính ngang của nhân $<$ kích thước quang halo $<$ đường kính ngang của nhân.

(3) Tinh trùng có quang halo nhỏ (Small halo): Kích thước quang halo $\leq 1/3$ đường kính ngang của nhân.

(4) Tinh trùng không có quang halo (Without halo).

(5) Tinh trùng thoái hóa (Degraded): Tinh trùng có nhân bắt màu kém, không đều.

- Tư vấn kết quả:

+ DFI $< 15\%$ là tỷ lệ đứt gãy DNA tinh trùng thấp.

+ DFI: 15 - 30%: tỷ lệ đứt gãy DNA tinh trùng trung bình.

+ DFI $> 30\%$: tỷ lệ đứt gãy DNA tinh trùng cao

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu có liên quan đến quy trình và lưu hồ sơ xét nghiệm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: mẫu tinh dịch có mật độ tinh trùng quá thấp.

- Xử trí: có thể ly tâm thu cặn trước khi thực hiện kỹ thuật.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Sai sót: Toàn bộ tinh trùng trong các vi trường không có quầng halo
- Xử trí: Kiểm tra quá trình nhuộm và cho cón vào ngâm trong 2 phút, rửa sạch tiêu bản và nhuộm lại.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Sai sót; kết thúc quy trình làm tiêu bản mà thấy trên tiêu bản màu thuốc nhuộm nhạt.
- Xử trí: Ngâm tiêu bản trong cón 2 phút, rửa sạch và nhuộm lại.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Yêu cầu thực hiện nội kiểm chất lượng.
- Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù (Yêu cầu thực hiện ngoại kiểm không bắt buộc).

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Avendano C., Franchi A., Duran H. et al (2010). DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility and Sterility*, 94(2), 549 - 557.
2. Cassuto N.G, Hazout A., Hammoud I. et al (2012). Correlation between DNA defect and sperm-head morphology. *Reproductive Biomedicine Online*, 24(2), 211 - 218.
3. Irvine D.S, Twigg J.P, Gordon E.L. et al (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology*, 21(1), 33 - 44.
4. Sheikh N, Amiri I, Farimani M. et al (2008). Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 6(1), 13 - 18.
5. Mã Phạm Quế Mai, Nguyễn Thị Thúy An và cs (2014). Khảo sát mối tương quan giữa các chỉ số tinh dịch đồ và chỉ số phân mảnh DNA tế bào tinh trùng người bằng phương pháp Neutral Comet. *Hội nghị vô sinh nam và nam học lần III*, 2014.
6. Organization W.H. (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, Switzerland.

7. Lương Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Trang, Hoàng Thu Lan, Nguyễn Xuân Tùng (2018). Mối liên quan giữa DFI và các chỉ số tình dục đồ ở nam giới thất bại trong hỗ trợ sinh sản. *Tạp chí Y học Việt Nam* số đặc biệt tháng 8 năm 2018, 469, 498-505.